

PCT

世界知的所有権機関

国際事務局

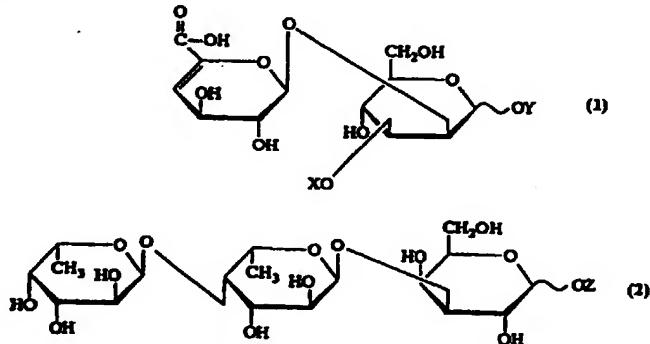


特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 C07H 11/00, C12N 9/24, 1/20, C12P 19/14	A1	(11) 国際公開番号 WO96/34004
		(43) 国際公開日 1996年10月31日(31.10.96)
(21) 国際出願番号 PCT/JP96/01080		
(22) 国際出願日 1996年4月22日(22.04.96)		
(30) 優先権データ 特願平7/127453 1995年4月28日(28.04.95) JP		
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 賣酒造株式会社 (TAKARA SHUZO CO., LTD.)[JP/JP] 〒612 京都府京都市伏見区竹中町609番地 Kyoto, (JP)		
株式会社 糖鎖工学研究所 (RESEARCH INSTITUTE FOR GLYCOTECHNOLOGY)[JP/JP] 〒036 青森県弘前市大字在府町82番地4 Aomori, (JP)		
(72) 発明者: および		
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 酒井 武(SAKAI, Takeshi)[JP/JP] 木村ひとみ(KIMURA, Hitomi)[JP/JP] 児島 薫(KOJIMA, Kaora)[JP/JP] 中西芳邦(NAKANISHI, Yoshikuni)[JP/JP] 加藤都之進(KATO, Iku no shin)[JP/JP] 〒036 青森県弘前市大字在府町82番地4 株式会社 糖鎖工学研究所内 Aomori, (JP)		

(54) Title : SUGAR COMPOUNDS

(54) 発明の名称 糖化合物



(57) Abstract

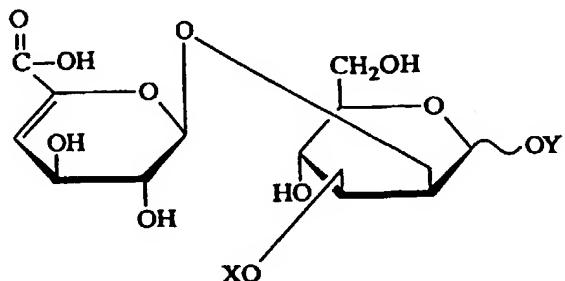
The invention provides a novel endo-type fucoidan hydrolase and a novel microorganism useful for producing sugar compounds. The sugar compounds refer to the compounds represented by general formula (1), wherein at least one alcoholic hydroxyl group has been sulfated, and salts thereof, wherein Y represents hydrogen or a group of general formula (2).

(57) 要約

新規なエンド型のフコイダン分解酵素、及び糖化合物の製造に有用な新規微生物を提供する。

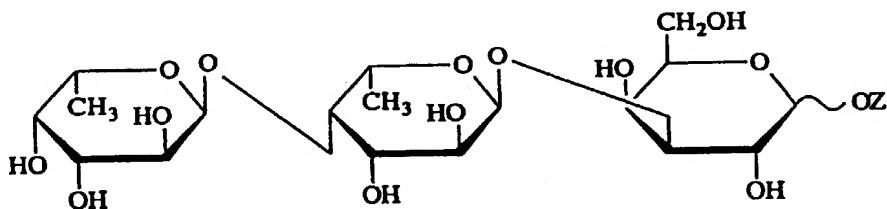
下記一般式 (1) :

(1)



[式中、YはH又は下記式 (2) :

(2)



で表される基を示す] で表される化合物中の少なくとも一つのアルコール性水酸基が硫酸エステル化している糖化合物又はその塩。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	PL	ポーランド
AM	アルメニア	DK	デンマーク	LC	セントルシア	PT	ポルトガル
AT	オーストリア	EE	エストニア	LL	スリランカ	ROU	ルーマニア
AU	オーストラリア	ES	スペイン	LR	リベリア	SDN	ロシダーン
AZ	アゼルバイジャン	FI	フィンランド	LS	レソトニアニア	SSG	スウェーデン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SI	シンガポール
BB	バルバドス	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	SSK	シリヴェニア
BE	ベルギー	GB	イギリス	MC	モナコ	SKN	スロヴァキア
BF	ブルキナ・ファソ	GE	グルジア	MD	モルドバ共和国	SZ	セネガル
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TD	スウェーデン
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラ	TG	トーゴ
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	ML	ミャンマー	TJ	タジキスタン
BY	ベラルーシ	I	アイルランド	MN	モンゴル	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	IE	イスラエル	MR	モーリタニア	TR	トルコ
CF	中央アフリカ共和国	IS	イスラマンド	MW	マラウイ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	IT	イタリア	MX	メキシコ	UGA	ウクライナ
CH	スイス	JP	日本	NE	ニジェール	UGS	ウガンダ
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	NL	オランダ	USA	アメリカ合衆国
CM	カメルーン	KG	キルギスタン	NO	ノルウェー	US	アメリカ合衆国
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NZ	ニュージーランド	UZ	ウズベキスタン
CU	キューバ	KR	大韓民国			VN	ヴィエトナム
CZ	チェコ共和国	KZ	カザフスタン				

明細書

糖化合物

技術分野

本発明は糖質研究の分野において有用な糖化合物、該糖化合物の生産に有用な糖分解酵素、及び該糖化合物の製造に有用なフコイダンノバクター (*Fucoidanobacter*) 属細菌に関する。

背景技術

フコイダンは褐藻類に含まれる硫酸化多糖であり抗血液凝固作用、脂血清澄作用、抗腫瘍作用、癌転移抑制作用、抗エイズウィルス感染作用等様々な生物活性が報告されており、医薬品として極めて有用な物質である。

しかしながら、フコイダンは極めて分子量が大きな硫酸化多糖であり、そのまま医薬品として用いるには抗原性、均一性、抗凝血活性等の問題があるので、フコイダンをある程度分解することを必要とされることが多い。

そのため、フコイダンの構造を解明し、生物活性との関係を解明することが望まれていたが、フコイダンは分岐が多い高分子であり、構成糖の種類も多く、硫酸基も様々な位置に結合しているため、構造解析は非常に困難であった。多糖の構造解析には、多糖を分解する酵素を作用させ、生成するオリゴ糖の構造を解析していく方法があるが、現在報告されているフコイダン分解酵素の中で分解生成物の糖鎖構造が判明しているものやフコイダンオリゴ糖の標準品となるものは市販品がない。

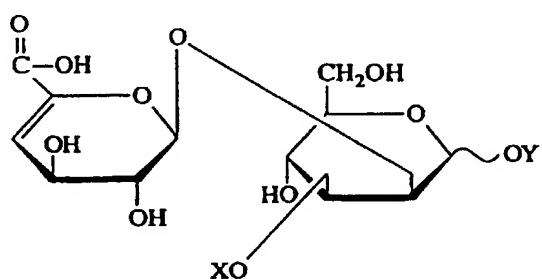
上記のような理由で、構造が判明した糖化合物、該糖化合物の製造に有用な糖分解酵素、及び該糖化合物の製造に有用な微生物が求められていた。

本発明の目的は、フコイダンの構造解析、フコイダンの酵素分解物の同定、及び生物活性の検索に用いることができる糖化合物、フコイダンの部分分解、フコイダンオリゴ糖の生産などフコイダンに関する研究に有用な新規なエンド (endo)

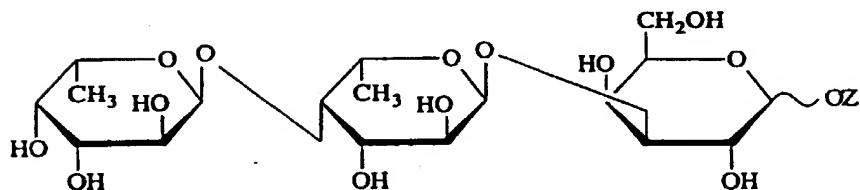
型のフコイダン分解酵素、及び糖化合物の製造に有用な新規微生物を提供することにある。

本発明を概説すれば、本発明の第1の発明は、下記一般式(1)又は(2)：

(1)

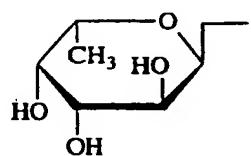


(2)



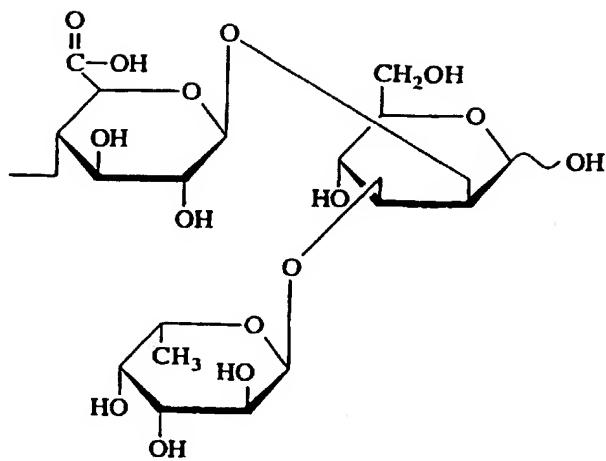
[式中、XはH又は下記式(3)：

(3)

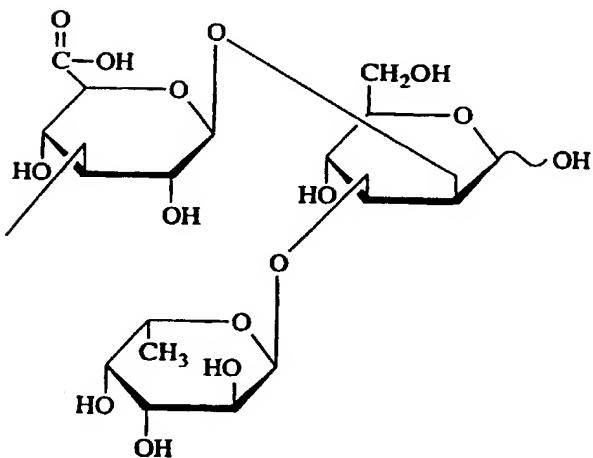


で表される基を示し、YはH又は下記式（4）、若しくは（5）：

(4)

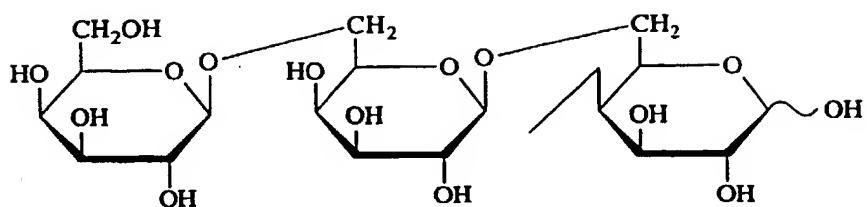


(5)



で表される基を示すが、XとYが共にHであることはない。また、ZはH又は下記式（6）：

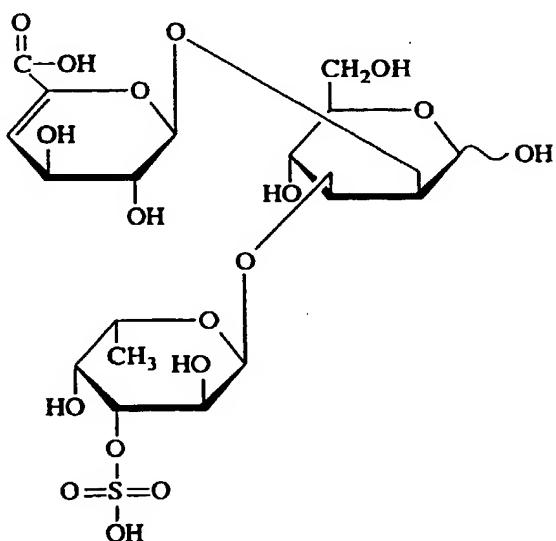
(6)



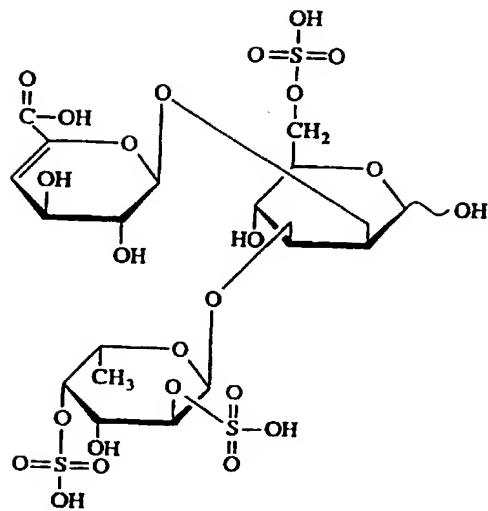
で表される基を示す] で表される化合物の少なくとも一つのアルコール性水酸基が硫酸エステル化している糖化合物又はその塩に関する。

前記一般式 (1) 又は (2) で表される化合物の例としては、下記の式 (7) ~式 (15) で表される化合物が挙げられる。

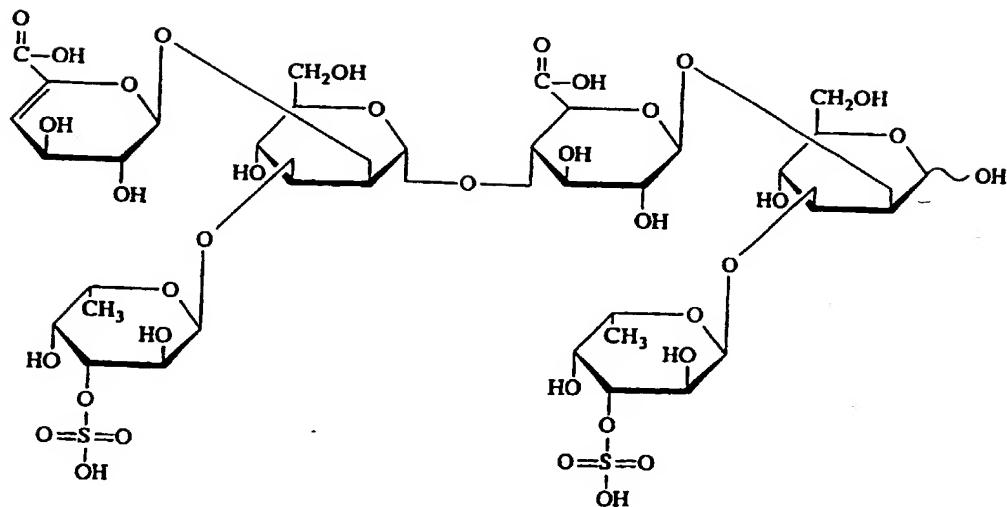
(7)



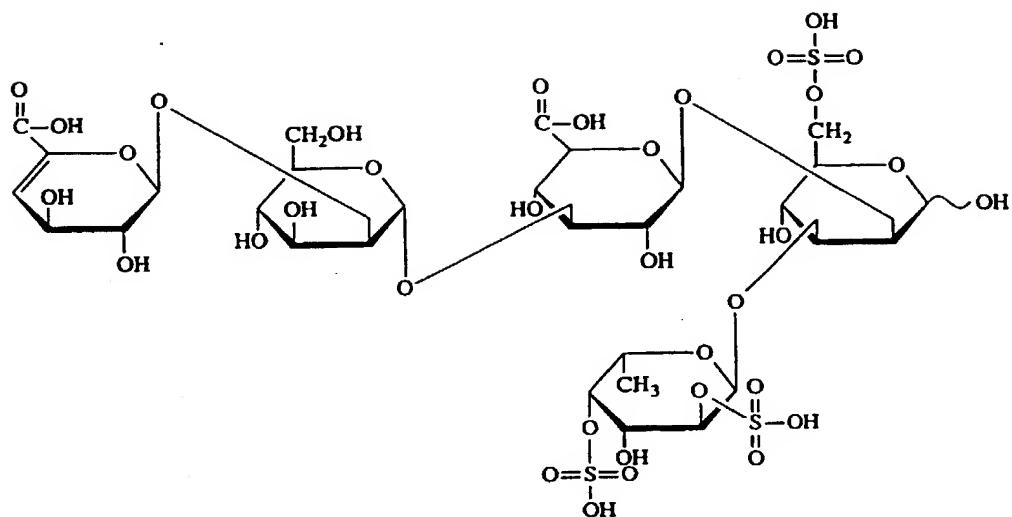
(8)



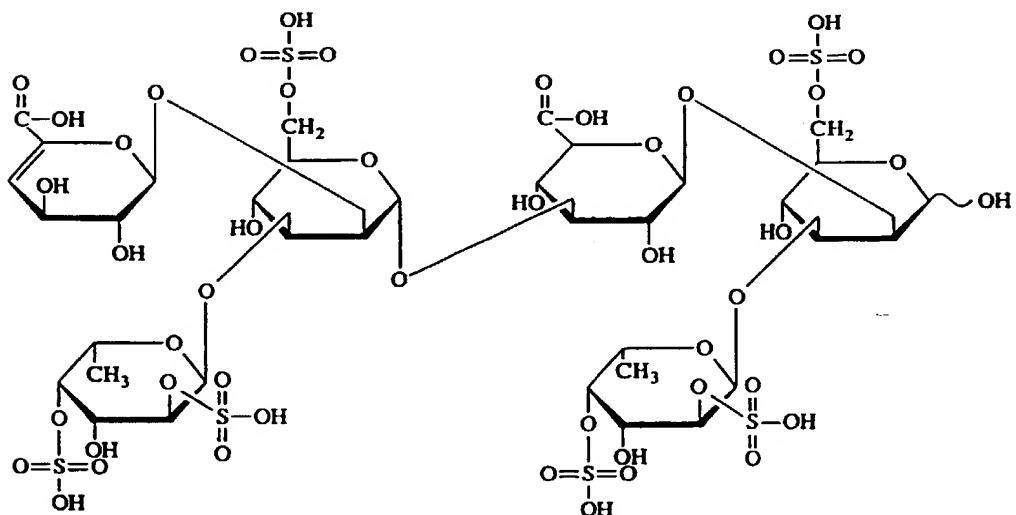
(9)



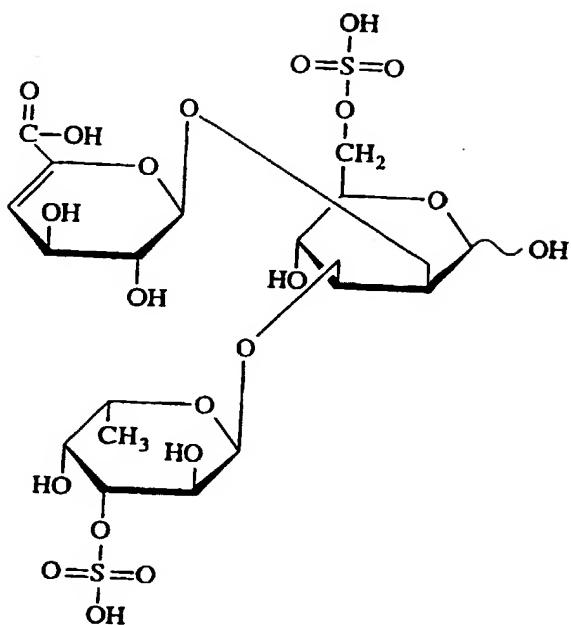
(10)



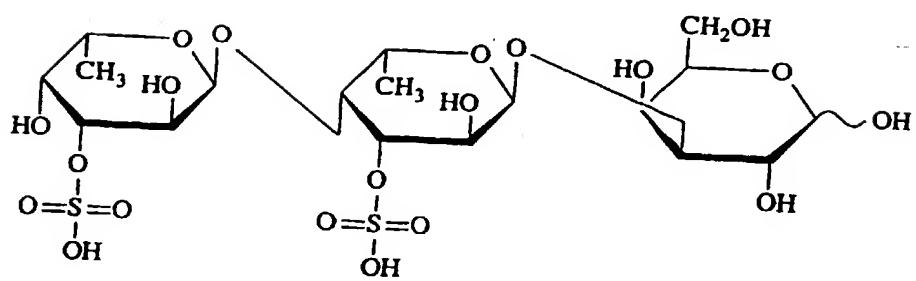
(11)



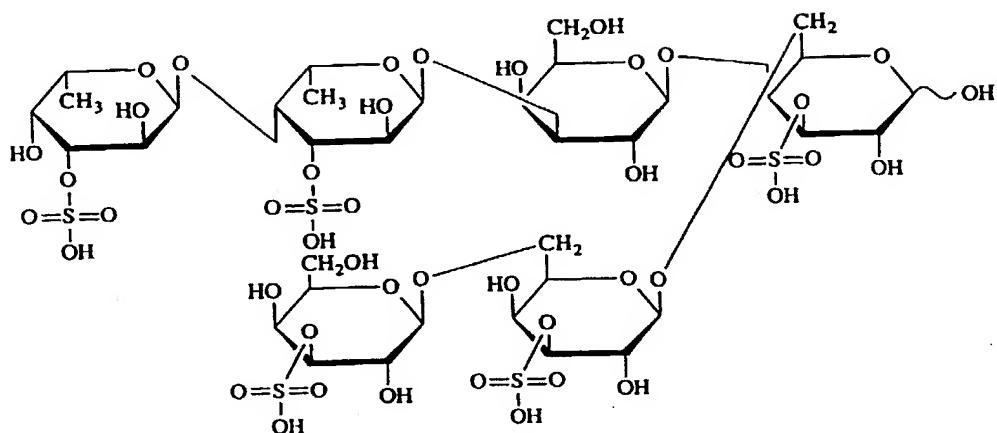
(12)



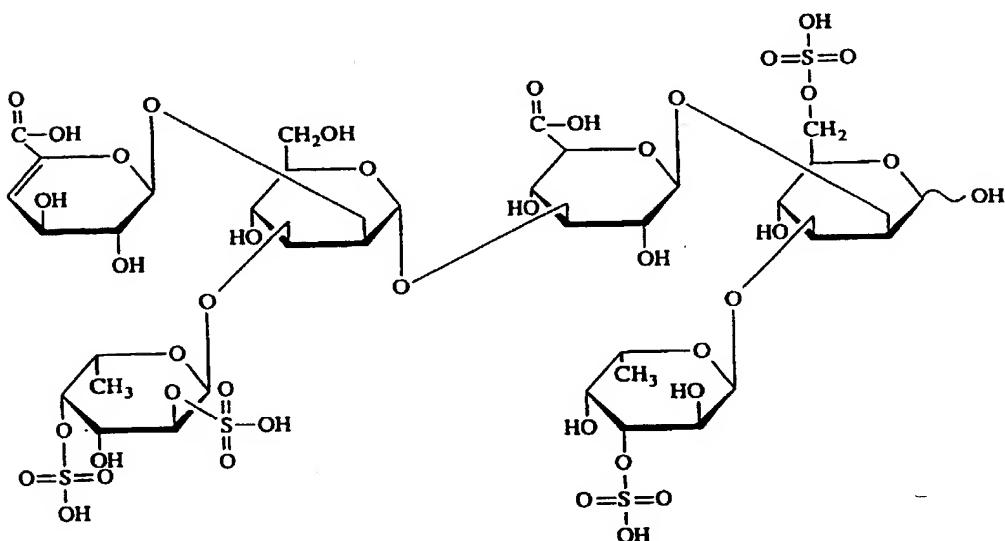
(13)



(14)



(15)



本発明の第2の発明は、下記の理化学的性質を有することを特徴とするエンド型フコイダン分解酵素に関する。

(I) 作用：フコイダンに作用して、少なくとも前記式(7)及び式(8)で表される化合物を遊離させる。

(II) 至適 pH：本酵素の至適 pH は 6 から 10 である。

(III) 至適温度：本酵素の至適温度は 30 から 40 °C である。

また本発明の第 3 の発明は、本発明の第 1 の発明である糖化合物の製造に有用な新規微生物である、電子伝達鎖にメナキノンを有し、GC 含量が約 60 % であるフコイダノバクター属に属する細菌に関する。

本明細書に記載の式 (1)、(2)、(4)～(15)、及び (17)～(25) 中の「～」は、マンノース、又はガラクトースに α アノマー、 β アノマーの両アノマーが存在することを意味する。

本発明者らは、本発明の第 2 の発明である酵素又は本発明の第 3 の発明である細菌の菌体抽出物又は培養液上清をフコイダンに作用させると、本発明の糖化合物が得られることを見出し、本発明を完成させた。

図面の簡単な説明

図 1 は糖化合物 (a) のビリジルー (2) - アミノ化糖化合物 (PA-a) を L-カラムにより分離したときの溶出パターンを示す図である。

図 2 は糖化合物 (b) のビリジルー (2) - アミノ化糖化合物 (PA-b) を L-カラムにより分離したときの溶出パターンを示す図である。

図 3 は糖化合物 (c) のビリジルー (2) - アミノ化糖化合物 (PA-c) を L-カラムにより分離したときの溶出パターンを示す図である。

図 4 は糖化合物 (d) のビリジルー (2) - アミノ化糖化合物 (PA-d) を L-カラムにより分離したときの溶出パターンを示す図である。

図 5 は糖化合物 (e) のビリジルー (2) - アミノ化糖化合物 (PA-e) を L-カラムにより分離したときの溶出パターンを示す図である。

図 6 は糖化合物 (f) のビリジルー (2) - アミノ化糖化合物 (PA-f) を L-カラムにより分離したときの溶出パターンを示す図である。

図 7 は糖化合物 (g) のビリジルー (2) - アミノ化糖化合物 (PA-g) を

L-カラムにより分離したときの溶出パターンを示す図である。

図8は糖化合物(h)のピリジル-(2)-アミノ化糖化合物(PA-h)を
L-カラムにより分離したときの溶出パターンを示す図である。

図9は糖化合物(i)のピリジル-(2)-アミノ化糖化合物(PA-i)を
L-カラムにより分離したときの溶出パターンを示す図である。

図10は糖化合物(a)のマス分析(ネガティブ測定)により得られた結果を
示す図である。

図11は糖化合物(b)のマス分析(ネガティブ測定)により得られた結果を
示す図である。

図12は糖化合物(c)のマス分析(ネガティブ測定)により得られた結果を
示す図である。

図13は糖化合物(d)のマス分析(ネガティブ測定)により得られた結果を
示す図である。

図14は糖化合物(e)のマス分析(ネガティブ測定)により得られた結果を
示す図である。

図15は糖化合物(f)のマス分析(ネガティブ測定)により得られた結果を
示す図である。

図16は糖化合物(g)のマス分析(ネガティブ測定)により得られた結果を
示す図である。

図17は糖化合物(h)のマス分析(ネガティブ測定)により得られた結果を
示す図である。

図18は糖化合物(i)のマス分析(ネガティブ測定)により得られた結果を
示す図である。

図19は糖化合物(a)のマスマス分析(ネガティブ測定)により得られた結
果を示す図である。

図20は糖化合物（b）のマスマス分析（ネガティブ測定）により得られた結果を示す図である。

図21は糖化合物（c）のマスマス分析（ネガティブ測定）により得られた結果を示す図である。

図22は糖化合物（d）のマスマス分析（ネガティブ測定）により得られた結果を示す図である。

図23は糖化合物（e）のマスマス分析（ネガティブ測定）により得られた結果を示す図である。

図24は糖化合物（f）のマスマス分析（ネガティブ測定）により得られた結果を示す図である。

図25は糖化合物（g）のマスマス分析（ネガティブ測定）により得られた結果を示す図である。

図26は糖化合物（h）のマスマス分析（ネガティブ測定）により得られた結果を示す図である。

図27は糖化合物（i）のマスマス分析（ネガティブ測定）により得られた結果を示す図である。

図28は糖化合物（a）の¹H-NMRスペクトルを表す図である。

図29は糖化合物（b）の¹H-NMRスペクトルを表す図である。

図30は糖化合物（c）の¹H-NMRスペクトルを表す図である。

図31は糖化合物（d）の¹H-NMRスペクトルを表す図である。

図32は糖化合物（e）の¹H-NMRスペクトルを表す図である。

図33は糖化合物（f）の¹H-NMRスペクトルを表す図である。

図34は糖化合物（g）の¹H-NMRスペクトルを表す図である。

図35は糖化合物（h）の¹H-NMRスペクトルを表す図である。

図36は糖化合物（i）の¹H-NMRスペクトルを表す図である。

図37は本発明の第2の発明である酵素のpHと相対活性(%)の関係を表す図である。

図38は本発明の第2の発明である酵素の反応温度(℃)と相対活性(%)の関係を表す図である。

図39は本発明の第2の発明である酵素を処理したpHと残存活性(%)の関係を表す図である。

図40は本発明の第2の発明である酵素の処理温度(℃)と残存活性(%)の関係を表す図である。

図41は糖化合物(a)～(i)をDEAE-セファロースFFにより分離したときの溶出パターンを示す図である。

図42は糖化合物(h)及び(i)をDEAE-セファロースFFにより分離したときの溶出パターンを示す図である。

以下、本発明に関して詳細に説明する。

本発明の第2の発明に使用される菌株としてはフラボバクテリウム(Flavobacterium)属に属し、本発明のエンド型フコイダン分解酵素生産能を有する菌株であればいかなる菌株でも良い。また、該エンド型フコイダン分解酵素生産能を有する菌株の具体例としては、例えばフラボバクテリウム sp. SA-0082株が挙げられる。該菌株由来のエンド型フコイダン分解酵素をフコイダンに作用させれば、本発明の第1の発明である糖化合物を得ることができる。

本菌株は青森県の海水中より本発明者らが新たに検索して得た菌株で、その菌学的性質は次の通りである。

1. フラボバクテリウム sp. SA-0082株

a. 形態的性質

(1) 本菌は短かん菌である。

幅 0.8~1.0 μm

長さ 1.0~1.2 μm

(2) 胞子の有無 なし

(3) グラム染色性 陰性

b. 生理的性質

(1) 生育の温度範囲

37°C以下で生育できる。好適な生育温度は15~28°Cである。

(2) 酸素に対する態度 好気性

(3) カタラーゼ 陽性

(4) オキシダーゼ 陽性

(5) ウレアーゼ 弱陽性

(6) 酸の生成

D-グルコース 陽性

ラクトース 陽性

マルトース 陽性

D-マンニトール 陽性

スクロース 陰性

トレハロース 陰性

(7) 加水分解

デンプン 陰性

ゼラチン 陽性

カゼイン 陰性

エスクリン 陽性

(8) 硝酸塩の還元 陰性

(9) インドールの生成 陰性

(10) 硫化水素の生成 陰性

- (11) ミルクの凝固 陰性
(12) ナトリウムの要求性 陽性
(13) 塩類要求性
 0%食塩培地での生育 陰性
 1%食塩培地での生育 陰性
 海水培地での生育 陽性
(14) キノン系 メナキノン6
(15) 菌体内DNAのGC含量 32%
(16) OF-テスト 0
(17) 集落の色調 黄色系
(18) 運動性 なし
(19) 滑走性 なし

本菌株は、バージーズ マニュアル オブ システィマティック バクテリオロジー (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology)、第1巻 (1984) 及びバージーズ マニュアル オブ ディターミネイティブ バクテリオロジー (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology)、第9巻 (1994) に記載のフラボバクテリウム アクアタイル (*Flavobacterium aquatile*)、及びフラボバクテリウム メニンゴセプチカム (*Flavobacterium meningosepticum*) の類縁細菌と考えられるが、前者とはスクロースを資化して酸を形成しない点、カゼインを分解できない点、エスクリンを分解できる点、ゼラチンを液化できる点、ウレアーゼが陽性である点が異なり、後者とはカゼインが分解できない点、37°Cでの生育が遅い点が異なる。そこで本菌株をフラボバクテリウムに属する細菌と同定し、フラボバクテリウム sp. SA-0082と命名した。

なお、上記菌株は *Flavobacterium* sp. SA-0082と表示され、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 [あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目

1番3号（郵便番号305）]にFERM BP-5402（原寄託日：平成7年3月29日、国際寄託日への移管請求日：平成8年2月15日）として寄託されている。

本発明の第2の発明に使用する菌株の培地に加える栄養源は使用する菌株が利用し、本発明の第2の発明であるエンド型フコイダン分解酵素を生産するものであればよく、炭素源としては例えばフコイダン、海藻粉末、アルギン酸、フコース、グルコース、マンニトール、グリセロール、サッカロース、マルトース、ラクトース、デンプン等が利用でき、窒素源としては、酵母エキス、ペプトン、カザミノ酸、コーンスティーブリカー、肉エキス、脱脂大豆、硫安、塩化アンモニウム等が適当である。その他にナトリウム塩、リン酸塩、カリウム塩、マグネシウム塩、亜鉛塩等の無機質、及び金属塩類を加えてよい。

また本菌株は上記栄養源を含んだ海水あるいは人工海水中で非常に良く生育する。

本発明の第2の発明であるエンド型フコイダン分解酵素の生産菌を培養するに当たり、生産量は培養条件により変動するが、一般に培養温度は、15℃～30℃、培地のpHは5～9がよく、5～72時間の通気かくはん培養で本発明のエンド型フコイダン分解酵素の生産量は最高に達する。培養条件は使用する菌株、培地組成等に応じ、本発明のエンド型フコイダン分解酵素の生産量が最大になるように設定するのは当然のことである。

本発明の第2の発明であるエンド型フコイダン分解酵素は菌体中にも培養物上清中にも存在する。

上記のラボバクテリウム sp. SA-0082株を適当な培地で培養し、その菌体を集め、通常用いられる細胞破壊手段、例えば、超音波処理などで菌体を破碎すると無細胞抽出液が得られる。

次いで、この抽出液から通常用いられる精製手段により精製酵素標品を得るこ

とができる。例えば、塩析、イオン交換カラムクロマト、疎水結合カラムクロマト、ゲルろ過等により精製を行い、他のフコイダン分解酵素を含まない純化された本発明の第2の発明であるエンド型フコイダン分解酵素を得ることができる。

また、上述の培養液から菌体を除去した培養液上清中にも本酵素（菌体外酵素）が大量に存在するので、菌体内酵素と同様の精製手段により精製することができる。

本発明の第2の発明であるエンド型フコイダン分解酵素の化学的及び理化学的性質は次の通りであり、菌体内酵素、菌体外酵素は分子量以外は同一の性質を示す。

(I) 作用：フコイダンに作用して、少なくとも前記式(7)及び式(8)で表される糖化合物を遊離させる。

(II) 至適pH：本酵素の至適pHは6から10である(図37)。

すなわち図37は、本酵素のpHと相対活性の関係を表すグラフであり、縦軸は相対活性(%)、横軸はpHを示す。

(III) 至適温度：本酵素の至適温度は30から40°Cである(図38)。

すなわち図38は、本酵素の温度と相対活性の関係を表すグラフであり、縦軸は相対活性(%)、横軸は温度(°C)を示す。

(IV) pH安定性：本酵素はpH6～11.5の間で安定である(図39)。

すなわち図39は、本酵素を処理したpHと残存活性の関係を表すグラフであり、縦軸は残存活性(%)、横軸はpHを示す。

(V) 温度安定性：本酵素は約30°C以下で安定である(図40)。

すなわち図40は、本酵素を処理した温度と残存活性の関係を表すグラフであり、縦軸は残存活性(%)、横軸は処理温度(°C)を示す。

(VI) 分子量：本酵素の分子量を、セファクリル(Sephacryl)S-200(ファルマシア製)を用いたゲルろ過法により求めたところフラボバクテリウム sp. S

A-0082株の菌体外酵素の場合は約7万であり、同菌体内酵素の場合は約46万であった。

(VII) 酵素活性の測定方法：

本発明の第2の発明であるエンド型フコイダン分解酵素の酵素活性の測定は次のようにして行った。

すなわち、2.5%のガゴメ昆布由来のフコイダン溶液 $50\mu l$ と、 $10\mu l$ の本発明の第2の発明であるエンド型フコイダン分解酵素と、 $60\mu l$ の 667mM 塩化ナトリウムを含む 83mM リン酸緩衝液pH7.5を混合し、 37°C 、3時間反応させた後、反応液 $105\mu l$ と水 2ml を混合かくはんし、その 230nm における吸光度(AT)を測定した。対照として、本発明の第2の発明であるエンド型フコイダン分解酵素の代りに、本発明の酵素を溶解している上記緩衝液のみを用いて同様の条件により反応させたもの及びフコイダン溶液の代りに水のみを用いて反応を行ったものを用意し、それぞれ同様に吸光度を測定した(AB1及びAB2)。

1単位の酵素は、上記反応系において1分間に $1\mu\text{mol}$ のマンノースとウロン酸の間のグリコシド結合を脱離的に切断する酵素量とする。切断された結合の定量は、脱離反応の際に生じた不飽和ウロン酸のミリモル分子吸光係数を5.5として計算し行った。なお、酵素の活性は下記式により求めた。

$$(AT - AB1 - AB2) \times 2.105 \times 120 / 5.5 \times 105 \times 0.01$$

$$\times 180 = U/\text{ml}$$

2. 105：吸光度を測定するサンプルの液量(ml)

120：酵素反応液の液量(μl)

5.5：不飽和ウロン酸の 230nm におけるミリモル分子吸光係数(/mM)

105：希釈に用いる反応液の液量(μl)

0.01：酵素液量(ml)

180：反応時間（分）

タンパク質の定量は、酵素液の280 nmの吸光度を測定することにより行った。その際1 mg/mlのタンパク質溶液の吸光度を1.0として計算した。本発明者らは、以下に述べるごとく、本発明の第2の発明であるエンド型フコイダン分解酵素の作用機作を決定した。

(1) ガゴメ昆布フコイダンの調製

乾燥ガゴメ昆布を自由粉碎機M-2型（奈良機械製作所製）により粉碎し、10倍量の85%メタノール中で70℃、2時間処理後、ろ過し、残渣を10倍量のメタノール中で70℃、2時間処理し、ろ過した。残渣に20倍量の水を加え、100℃、3時間処理しろ過により抽出液を得た。抽出液の塩濃度を400 mMの塩化ナトリウム溶液と同じにした後、セチルピリジニウムクロリドをこれ以上沈殿が生じなくなるまで添加し、遠心分離した。その沈殿を、エタノールで十分洗浄し、セチルピリジニウムクロリドが完全に除去できたら、限外ろ過器（ろ過膜の排除分子量10万）（アミコン社製）により脱塩及び低分子除去を行い、この際生じた沈殿を遠心分離により除去した。この上清を凍結乾燥して精製ガゴメ昆布フコイダンを得た。収率は、乾燥ガゴメ昆布粉末重量に対して約4%であった。

(2) エンド型フコイダン分解酵素によるフコイダンの分解及び分解物の精製

精製したガゴメ昆布由来のフコイダンに本発明の第2の発明であるエンド型フコイダン分解酵素を作用させ分解物の大規模調製を行った。

すなわち、5%のガゴメ昆布由来のフコイダン溶液600 mlと、100 mMのリン酸緩衝液(pH 8.0) 750 mlと4 Mの塩化ナトリウム150 mlと1750 mU/mlの本発明のエンド型フコイダン分解酵素溶液3.43 mlを混合し、25℃で144時間反応させた。

反応液をボアサイズ3500の透析膜を用いて透析し、分子量3500以下の

画分を集めた。この画分をマイクロアシライザーG3(旭化成社製)により脱塩後、DEAE-セファロースFFにより9つの画分(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)、及び(i)に分画した。その溶出パターンを図41に示す。横軸はフラクションナンバーを示し、左の縦軸及び図中の黒丸は、フェノール硫酸法による糖含量を480nmの吸光度で示し、右の縦軸及び図中の白丸は、不飽和グルクロン酸の含量を235nmの吸光度で示し、最も右の縦軸及び図中の点線は、溶出液中の酢酸アンモニウム濃度(M)を示す。各画分のフラクションナンバーは、それぞれ(a):42~43、(b):84~91、(c):51~52、(d):79、(e):102~103、(f):62~63、(g):45、(h):75、及び(i):77であった。

画分(h)及び(i)については上記のフラクションナンバー64~78を集め、DEAE-セファロースFFにより、再精製を行った。その溶出パターンを図42に示す。横軸はフラクションナンバーを示し、左の縦軸及び図中の黒丸は、フェノール硫酸法による糖含量を480nmの吸光度で示し、右の縦軸及び図中の白丸は、不飽和グルクロン酸の含量を235nmの吸光度で示し、最も右の縦軸及び図中の点線は、溶出液中の酢酸アンモニウム濃度(M)を示す。各画分のフラクションナンバーはそれぞれ(h):92~96、及び(i):99~103であった。

(3) 酵素反応生成物の構造解析

(ア) 各画分の均一性の確認

上記の9つの画分(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)、及び(i)をそれぞれ一部だけGlycoTAGおよびGlycoTAG Reagent Kit(共に宝酒造社製)を用いて還元性末端を2-アミノビリジル化(PA化)し、各PA化糖(PA-a)、(PA-b)、(PA-c)、(PA-d)、(PA-e)、(PA-f)、(PA-g)、(P

、及び (PA-i) を得た。 (PA-a) 、 (PA-b) 、 (PA-c) 、
 (PA-d) 、 (PA-e) 、 (PA-f) 、 (PA-g) 、 (PA-h)
 及び (PA-i) は HPLC 分析によりそれぞれ均一であることが判明し

、 HPLC の条件は下記によった。

： L-6200 型（日立製作所製）

ム： L-カラム (4.6 × 250 mm) { (財) 化学薬品検査協会
 }

液： 前記式 (7) 、 (8) 、及び (9) [(PA-a) 、 (PA-b) 、
 及び (PA-c)] の物質に対しては

50 mM 酢酸一トリエチルアミン (pH 5.5)

前記式 (10) 、 (12) 、 (13) 、及び (15) [(PA-d)
 、 (PA-f) 、 (PA-g) 、及び (PA-i)] の物質に対して
 は

100 mM 酢酸一トリエチルアミン (pH 5)

前記式 (11) [(PA-e)] の物質に対しては

0から10分までは 200 mM 酢酸一トリエチルアミン (pH 3.8)
) 10から60分までは 200 mM 酢酸一トリエチルアミン (pH 3.
 .8) と 0.5% のテトラヒドロフランを含む 200 mM 酢酸一トリ
 エチルアミン (pH 3.8) の比率を 100 : 0 から 20 : 80 に直
 線的に変化させた。

前記式 (14) [(PA-h)] の物質に対しては

0から60分まで 200 mM 酢酸一トリエチルアミン (pH 3.8)
 と 0.5% のテトラヒドロフランを含む 200 mM 酢酸一トリエチル
 アミン (pH 3.8) の比率を 80 : 20 から 50 : 50 に直線的に

変化させた。

検出：蛍光検出器 F-1150（日立製作所製）にて励起波長320nm、
蛍光波長400nmで検出。

流速：1ml/分

カラム温度：40°C

(イ) 酵素反応生成物の還元末端糖及び中性糖組成の分析

また、各PA化糖 (PA-a)、(PA-b)、(PA-c)、(PA-d)、(PA-e)、(PA-f)、(PA-g)、(PA-h)、及び(PA-i)を4規定の塩酸、100°C、3時間処理により加水分解し、HPLCにより還元末端糖を調べた。

また、この加水分解物をグライコタッグ（宝酒造社製）及びグライコタッグリージェント キット（宝酒造社製）を用いて還元性末端をPA化しHPLCにより中性糖組成を調べた。なお、HPLCの条件は下記によった。

装置：L-6200型（日立製作所製）

カラム：パルバックタイプA (4.6mm x 150mm) (宝酒造社製)

溶離液：700mMほう酸緩衝液 (pH 9.0) : アセトニトリル=9:1

検出：蛍光検出器 F-1150（日立製作所製）にて励起波長310nm、
蛍光波長380nmで検出。

流速：0.3ml/分

カラム温度：65°C

この結果、(PA-a)、(PA-b)、(PA-c)、(PA-d)、(PA-e)、(PA-f)、及び(PA-i)の還元性末端糖はすべてマンノースであった。また中性糖組成としては(PA-a)、(PA-b)、(PA-c)、(PA-e)、(PA-f)、及び(PA-i)がマンノースとフコースを等モル含んでおり、(PA-d)はマンノースとフコースの比率が2:1である。

った。

(PA-g) 及び (PA-h) の還元性末端糖は共にガラクトースであり、その中性糖組成としては (PA-g) はガラクトースとフコースの比が 1 : 2 であり、(PA-h) はガラクトースとフコースの比が 2 : 1 であった。

また、構成糖の一つであるマンノースの立体配置を調べるために F-キット グルコース／フルクトース及びホスホマンノースイソメラーゼ（共にベーリンガーマンハイムヤマノウチ製）を用い、説明書に従って D-マンノースのみを測定できる反応系を構築し、別に (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、及び (i) 各 100 μg を 2N の塩酸で 100°C、3 時間加水分解後中和したものとの反応系で測定した。この結果 (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、及び (i) のすべてから D-マンノースが検出されたので、(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、及び (i) の構成糖のマンノースはすべて D 型と判明した。

(g) 及び (h) の構成糖の一つであるガラクトースの立体配置を調べるために D 型のガラクトースのみを検出できる F-キット 乳糖／ガラクトース（ベーリンガーマンハイムヤマノウチ製）を用いた。すなわち、(g) 及び (h) 各 100 μg を 2N の塩酸で 100°C、3 時間加水分解後中和したものとのキットを用いて測定した。この結果、(g) 及び (h) からガラクトースが検出されたので (g) 及び (h) の構成糖のガラクトースはすべて D 型と判明した。

さらにもう一種の構成糖であるフコースの立体配置を調べるために、クリニカルケミストリー (Clinical Chemistry) 第 36 卷、第 474-476 頁 (1990) に記載の方法に従って、上記の (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h) 及び (i) 各 100 μg を 2N の塩酸で 100°C、3 時間加水分解後中和したものとの反応系で測定した。本反応系では D-フコースは検出されず L-フコースのみが検出できる。この結果

(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)及び(i)からL-フコースが検出された。

(ウ) 酵素反応生成物の分子量の分析

次に、(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)及び(i)をAPI-III質量分析器(バーキンエルマー・サイエクス社)を用いた質量分析に供したところ、それらの分子量は、それぞれ564、724、1128、1062、1448、644、632、1358、及び1288であった。(b)および(c)は2価の陰イオンが主なシグナルを形成した。(d)は1価のイオンとナトリウムがついた1価のイオン及び2価のイオンが検出された。

(e)はナトリウムイオンが4個ついた2価のイオン、ナトリウムイオンが3個ついた3価のイオン、及びナトリウムイオンが1個ついた4価のイオン等が検出された。(f)はナトリウムイオンが2個ついた1価のイオンが検出された。(g)は1価のイオンとナトリウムが結合した1価のイオン及び2価のイオンが検出された。(h)はナトリウムイオンが4個、3個、2個、及び1個ついた、それぞれ1価、2価、3価、及び4価のイオン等が検出された。(i)は硫酸基が2個はすれてナトリウムが1個ついた1価のイオン及び硫酸基が2個取れた2価のイオンが検出された。

また、ネガティブモードのマスマス(MS/MS)分析により(a)は一価の硫酸イオン(分子量97)、不飽和ヘキスロン酸から水分子と水素イオンが取れた一価イオン(分子量157)、不飽和ヘキスロン酸から水素イオンがとれた一価イオン(分子量175)、フコースと硫酸が結合したものから水分子と水素イオンが取れた一価イオン(分子量225)、フコースと硫酸が結合したものから水素イオンが取れた一価イオン(分子量243)、不飽和ヘキスロン酸とマンノースが結合したものから水分子と水素イオンが取れた一価イオン(分子量319)、フコースと硫酸とマンノースが結合したものから水素イオンが取れた一価イ

オン（分子量405）が検出された。

同様にネガティブモードのMS/MS分析により（b）は一価の硫酸イオン（分子量97）、不飽和ヘキスロン酸から水素イオンが取れた一価イオン（分子量175）、フコースと硫酸が結合したものから水素イオンが取れた一価イオン（分子量243）、不飽和ヘキスロン酸とフコースとマンノースと硫酸が2個結合したものから水素イオンが2個取れた2価イオン（分子量321）、フコースと硫酸とマンノースが結合したものから水素イオンが取れた一価イオン（分子量405）、不飽和ヘキスロン酸とマンノースと硫酸が結合したものから水素イオンが取れた一価イオン（分子量417）が検出された。

また、ネガティブモードのMS/MS分析により（c）は一価の硫酸イオン（分子量97）、不飽和ヘキスロン酸から水素イオンが取れた一価イオン（分子量175）、フコースと硫酸が結合したものから水分子と水素イオンが取れた一価イオン（分子量225）、フコースと硫酸が結合したものから水素イオンが取れた一価イオン（分子量243）、マンノースとヘキスロン酸とマンノースとフコースと硫酸が結合したものから水素イオンが2個取れた2価イオン（分子量371）、フコースと硫酸とマンノースが結合したものから水素イオンが取れた一価イオン（分子量405）、フコースと不飽和ヘキスロン酸とマンノースとヘキスロン酸と硫酸が結合したものから水と水素イオンが取れた一価イオン（分子量721）が検出された。

また、ネガティブモードのMS/MS分析により（d）の2価イオンから、1価の硫酸イオン（分子量97）、不飽和ヘキスロン酸から水素イオンが取れた1価イオン（分子量175）、フコースと硫酸が結合したものから水分子と水素イオンが取れた1価イオン（分子量225）、フコースと硫酸が結合したものから水素イオンが取れた1価イオン（分子量243）、フコースとマンノースと硫酸基が結合したものから水素イオンが取れた1価イオン（分子量405）、（d）

から硫酸基が2個取れ、水素イオンが2個取れた2価イオン（分子量450）、
(d) から硫酸基が1個取れ、水素イオンが2個取れた2価イオン（分子量490）が検出された。

また、ネガティブモードのMS/MS分析により(e)は一価の硫酸イオン（分子量97）、フコースと硫酸が結合したものから水分子と水素イオンが取れた一価イオン（分子量225）、フコースと硫酸が結合したものから水素イオンが取れた一価イオン（分子量243）、フコースと2分子の硫酸基とナトリウムイオンが結合したものから水素イオンが2個取れた一価イオン（分子量345）、(e)から2個の硫酸基がとれ、3個のナトリウムイオンがつき、6個の水素イオンがとれた3価イオン（分子量450）、(e)から1個の硫酸基と6個の水素イオンがとれ、3個のナトリウムイオンがついた3価イオン（分子量476）、不飽和ヘキスロン酸とマンノースとフコースと硫酸が結合したものから水素イオンがとれた1価イオン（分子量563）、及び不飽和ヘキスロン酸とマンノースとフコースと3分子の硫酸が結合したものから水分子と水素イオンがとれた1価イオン（分子量705）が検出された。

また、ネガティブモードのMS/MS分析により(f)は、一価の硫酸イオン（分子量97）、フコースと硫酸が結合したものから水素イオンが取れた一価イオン（分子量243）、不飽和ヘキスロン酸とマンノースと硫酸とナトリウムが結合したものから水と水素イオンが取れた一価イオン（分子量421）が検出された。

また、ネガティブモードのMS/MS分析により(g)は、フコースと硫酸とガラクトースが結合したものから水素イオンが取れた一価イオン（分子量405）及び、フコース2分子とガラクトース1分子と硫酸基1分子が結合したものから水素イオンが取れた1価イオン（分子量551）が検出された。

また、ネガティブモードのMS/MS分析により(h)に3分子のナトリウム

が結合し、5分子の水素イオンが取れたものから、1価の硫酸イオン（分子量97）、フコースと硫酸が結合したものから水分子と水素イオンが取れた一価イオン（分子量225）、フコース2分子とガラクトース4分子と硫酸基3分子が結合（分子量225）、フコース2分子とガラクトース4分子と硫酸基3分子が結合したものから水素イオンが1分子取れた一価イオン（分子量1197）が検出された。

また、ネガティブモードのMS/MS分析により（i）から硫酸基が2個取れた2価イオンから、1価の硫酸イオン（分子量97）、フコースと2分子の硫酸とナトリウムが結合したものから水素イオンが取れた1価イオン（分子量345）が検出された。

（エ）酵素反応生成物の糖組成の分析

上記質量分析の結果より（a）、（b）、（c）、（d）、（f）、及び（i）は分子内に不飽和ヘキスロン酸を含む可能性が極めて高いことが示唆された。

酵素反応生成物の分子内に不飽和結合のあるヘキスロン酸が存在することを証明するために以下の実験を行った。不飽和結合が分子内に存在すると230～240nmに強い吸収があることが知られている。そこで、精製した（a）、（b）、（c）、（d）、（e）、（f）、（g）、（h）、及び（i）の各オリゴ糖の水溶液の230～240nmの吸光度を測定すると（a）、（b）、（c）、（d）、（e）、（f）、及び（i）の水溶液には強い吸収があり、分子内に不飽和結合があることが示唆された。また、本酵素によるフコイダンの分解反応の進行と共に230～240nmの吸光度が増加することも確認されたので、本酵素はフコイダン中のマンノースとヘキスロン酸の間あるいは、ガラクトースとヘキスロン酸の間のグリコシド結合を脱離反応により切断することが強く示唆された。

酵素反応生成物のほとんどが非還元末端に不飽和ヘキスロン酸を持ち還元末端がマンノースであることから調製したフコイダンの中にはヘキスロン酸とマンノ

ースが交互に並んだ分子種が存在することが示唆された。

フコイダンの構成糖の多くはフコースであるためフコイダンは一般の多糖より酸により分解され易い。一方、ヘキスロン酸やマンノースの結合は比較的酸に強いことが知られている。本発明者らはガゴメ昆布のフコイダンの分子内に存在するヘキスロン酸とマンノースが交互に結合している分子種中のヘキスロン酸の種類を明らかにするためにカーボハイドレート リサーチ (Carbohydrate Research) 第125巻、第283-290頁、1984年の方 法を参考にして、まずフコイダンを0.3Mのシュウ酸に溶解し100℃、3時間処理したものを分子量分画し、分子量が3000以上の画分を集め、さらに陰イオン交換樹脂により吸着分を集めた。この物質を凍結乾燥後4Nの塩酸で酸加水分解し、pH 8に調整後、PA化し、HPLCによりウロン酸の分析を行った。なおHPLCの条件は下記によった。

装置：L-6200型（日立製作所製）

カラム：パルバックタイプN (4.6 mm × 250 mm) (宝酒造社製)

溶離液：200 mM酢酸-トリエチルアミン緩衝液 (pH 7.3) : アセトニトリル=25:75

検出：蛍光検出器F-1150（日立製作所製）にて励起波長320 nm、蛍光波長400 nmで検出。

流速：0.8 ml/分

カラム温度：40℃

なお、PA化ヘキスロン酸の標準物質はグルクロン酸はシグマ社製、ガラクトロン酸は和光純薬社製、イズロン酸はシグマ社製の4-メチルウンベリフェリル α -L-イズロニドを加水分解したもの、マンヌロン酸及びグルロン酸はアクタ・ケミカ・スカンヂナヴィカ (Acta Chemica Scandinavica)、第15巻、第1397-1398頁、1961年記載の方法にしたが

い、和光純薬製のアルギン酸を加水分解後陰イオン交換樹脂で分離したものをPA化することにより得た。

この結果、上記フコイダンの分子種中に含まれているヘキスロン酸はグルクロン酸のみであることが判明した。

さらに上記分子種の加水分解物中のグルクロン酸を陰イオン交換樹脂によりD-マンノースと分離し凍結乾燥後その比旋光度を測定したところ右旋性でありグルクロン酸はD-グルクロン酸であることが判明した。

また、ガゴメ昆布由来のフコイダンをあらかじめ本発明の第二の発明であるエンド型フコイダン分解酵素で処理したものについても上記と同様にシュウ酸で酸加水分解したが、D-グルクロン酸とD-マンノースが交互に結合したポリマーは検出されなかった。このことから、本発明の酵素が脱離反応により切断するフコイダンの分子種の骨格構造はD-グルクロン酸とD-マンノースが交互に結合した構造を持つことが判明した。

さらに、D-グルクロン酸とD-マンノースのそれぞれの結合位置とグリコシド結合のアノメリック配置を調べるため、シュウ酸分解により得られたポリマーをNMR分析した。

ポリマーのNMRの測定結果を以下に示す。但し、¹H-NMRでの化学シフト値はトリエチルアミンのメチル基の化学シフト値を1.13 ppmに、¹³C-NMRではトリエチルアミンのメチル基の化学シフト値を9.32 ppmとして表した。

¹H-NMR (D₂O)

δ 5.25 (1H, br-s, 1-H)、4.32 (1H, d, J=7.6Hz, 1'-H)、4.00 (1H, br-s, 2-H)、3.71 (1H, m, 5'-H)、3.69 (1H, m, 5-CHのH)、3.68 (1H, m, 3-H)、3.63 (1H, m, 5-CHのH)、3.63 (1H, m, 4'-H)

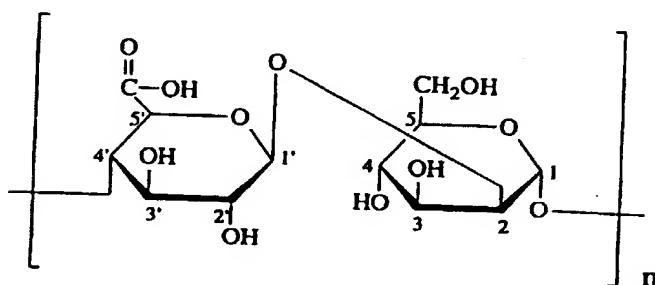
、 3. 57 (1 H, m, 4-H) 、 3. 54 (1 H, m, 3' -H) 、 3. 53 (1 H, m, 5-H) 、 3. 25 (1 H, t, J=8. 5 Hz, 2' -H)

¹³C-NMR (D₂O)

δ 175. 3 (5' -COOHのC) 、 102. 5 (1' -C) 、 99. 6 (1-C) 、 78. 5 (2-C) 、 77. 9 (4' -C) 、 77. 0 (3' -C) 、 76. 7 (5' -C) 、 73. 9 (5-C) 、 73. 7 (2' -C) 、 70. 6 (3-C) 、 67. 4 (4-C) 、 61. 0 (5-CH₂OHのC)

なお、ピークの帰属の番号は下記式(16)の通りである：

(16)



D-グルクロン酸の1位の立体配置はそのビシナル結合定数が7. 6 Hzであることからβ-D-グルクロン酸であると決定した。

また、マンノースの1位の立体配置はその化学シフト値が5. 25 ppmであることからα-D-マンノースであると決定した。

構成糖の結合様式は¹H検出異種核検出法であるHMB C法を用いて行った。

¹H-NMRの帰属にはDQF-COSY法及びHOHAHA法を、¹³C-NMRの帰属にはHSQC法を用いた。

HMB Cスペクトルにより1-Hと4' -Cの間及び4' -Hと1-Cの間、1' -Hと2-Cの間及び2-Hと1' -Cの間にそれぞれクロスピークが認められた。このことからD-グルクロン酸はβ結合でD-マンノースの2位に、D

-マンノースは α 結合でD-グルクロン酸の4位にそれぞれ結合していることが明らかとなった。

(オ) 酵素反応生成物の糖結合様式及び硫酸基の結合位置の分析

構成糖および硫酸基の結合様式を調べるために酵素反応生成物を500MHzの核磁気共鳴装置JNM- α 500型(日本電子製)によるNMRスペクトル分析に供した。この分析結果より(a)は前記式(7)、(b)は前記式(8)、(c)は前記式(9)、(d)は前記式(10)、(e)は前記式(11)、(f)は前記式(12)、(g)は前記式(13)、(h)は前記式(14)、及び(i)は前記式(15)で表されるものであることが判明した、すなわち(a)は、還元末端残基であるD-マンノースに不飽和D-グルクロン酸と、硫酸基が結合したL-フコースが結合した構造を持つこと、(b)は、硫酸基が結合した還元末端残基であるD-マンノースに不飽和D-グルクロン酸と2個の硫酸基が結合したL-フコースが結合した構造を持つこと、(c)は、還元末端残基であるD-マンノースにD-グルクロン酸と、硫酸基が結合したL-フコースが結合し、そのD-グルクロン酸にD-マンノースが結合し、さらにそのD-マンノースに不飽和D-グルクロン酸と硫酸基が結合したL-フコースが結合した構造を持つこと、(d)は、還元末端残基であるD-マンノースに硫酸基とD-グルクロン酸と、硫酸基が2分子結合したL-フコースが結合し、そのD-グルクロン酸に、D-マンノースが結合し、さらにそのD-マンノースに不飽和D-グルクロン酸が結合した構造を持つこと、(e)は、還元末端残基であるD-マンノースに硫酸基とD-グルクロン酸と、硫酸基が2分子結合したL-フコースが結合し、そのD-グルクロン酸に、硫酸基が結合したD-マンノースが結合し、さらにそのD-マンノースに、硫酸基が2分子結合したL-フコースと不飽和D-グルクロン酸が結合した構造を持つこと、(f)は、硫酸基が結合した還元末端残基であるD-マンノースに不飽和D-グルクロン酸と硫酸基が結合したL-フ

コースが結合した構造を持つこと、(g)は、還元末端残基であるD-ガラクトースに、硫酸基が結合したL-フコースが結合し、そのL-フコースに、硫酸基が結合したL-フコースが結合した構造を持つこと、(h)は、硫酸基が結合した還元末端残基であるD-ガラクトースを起点に2本に分岐した構造を持ち、一方の糖鎖は、D-ガラクトースに、硫酸基が結合したL-フコースが結合し、そのL-フコースに、硫酸基が結合したL-フコースが結合しており、他方の糖鎖は、硫酸基が結合したD-ガラクトースに、硫酸基が結合したD-ガラクトースが結合した構造を持つこと、(i)は、還元末端残基であるD-マンノースに硫酸基とD-グルクロン酸と、硫酸基が結合したL-フコースが結合し、そのD-グルクロン酸に、D-マンノースが結合し、さらにそのD-マンノースに、硫酸基が2個結合したL-フコースと不飽和D-グルクロン酸が結合した構造を持つことが判明した。

本発明の第2の発明であるエンド型フコイダン分解酵素をフコイダンに作用させることにより、本発明の第1の発明である糖化合物に含まれる化合物を得た。

下記に、本発明の第1の発明の糖化合物の例である式(7)、式(8)、式(9)、式(10)、式(11)、式(12)、式(13)、式(14)、及び式(15)で表される化合物、すなわち(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)、及び(i)の物性を示す。

図1、2、3、4、5、6、7、8、及び9には各ビリジル(-2-)アミノ化糖化合物(PA-a)、(PA-b)、(PA-c)、(PA-d)、(PA-e)、(PA-f)、(PA-g)、(PA-h)、及び(PA-i)、のHPLCの溶出パターンを示し、図において縦軸は相対蛍光強度、横軸は保持時間(分)を示す。さらに図10に(a)の、図11に(b)の、図12に(c)の、図13に(d)の、図14に(e)の、図15に(f)の、図16に(g)の、図17に(h)の、図18に(i)のマススペクトルを示し、図19に(a)

) の、図20に(b)の、図21に(c)の、図22に(d)の、図23に(e)の、図24に(f)の、図25に(g)の、図26に(h)の、図27に(i)のマスマスのスペクトルを示し、各図において縦軸は相対強度(%)、横軸はm/z値を示す。

更に図28は(a)の、図29は(b)の、図30は(c)の、図31は(d)の、図32は(e)の、図33は(f)の、図34は(g)の、図35は(h)の、図36は(i)の¹H-NMRスペクトルを示し、各図において縦軸はシグナルの強度、横軸は化学シフト値(ppm)を示す。

なお、¹H-NMRでの化学シフト値はHODの化学シフト値を4.65ppmとして表した。

(a) の物性

分子量564

MS m/z 563 [M-H⁺] -

MS/MS m/z 97 [HSO₄] - , 157 [不飽和D-グルクロン酸-H₂O-H⁺] - , 175 [不飽和D-グルクロン酸-H⁺] - , 225 [L-フコース硫酸-H₂O-H⁺] - , 243 [L-フコース硫酸-H⁺] - , 319 [不飽和D-グルクロン酸とD-マンノースが結合したもの-H₂O-H⁺] - , 405 [M-不飽和D-グルクロン酸-H⁺] - , 483 [M-SO₃-H⁺] -

¹H-NMR (D₂O)

δ 5.78 (1H, d, J=3.7Hz, 4"-H) , 5.26 (1H, d, J=1.2Hz, 1-H) , 5.12 (1H, d, J=4.0Hz, 1'-H) , 5.03 (1H, d, J=6.1Hz, 1"-H) , 4.47 (1H, d-d, J=3.4, 10.4Hz, 3'-H) , 4.21 (1H, br-s, 2-H) , 4.12 (1H, m, 5'-H) , 4.10 (1H, d-d, J=3.7,)

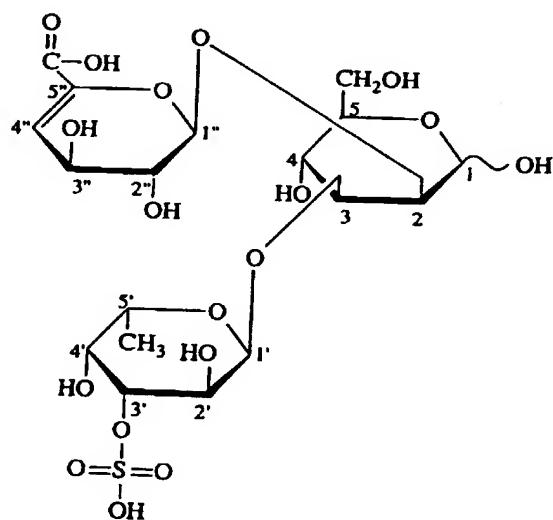
5. 8 Hz, 3'' - H) , 4. 03 ((1 H, d, J = 3. 4 Hz, 4' - H)
 , 3. 86 (1 H, m, 3 - H) , 3. 83 (1 H, d - d, J = 4. 0, 10
 . 4 Hz, 2' - H) , 3. 72 (1 H, m, 4 - H) , 3. 72 (1 H, m,
 5 - H) , 3. 70 (2 H, m, 5 - CH₂ の H₂) , 3. 65 (1 H, d - d
 . J = 5. 8, 6. 1 Hz, 2'' - H) , 1. 08 (3 H, d, J = 6. 7 Hz
 , 5' - CH₃ の H₃)

糖組成 L-フコース : 不飽和D-グルクロン酸 : D-マンノース = 1 : 1 : 1
 (各1分子)

硫酸基 1分子 (L-フコースの3位)

なお、¹H-NMRにおけるピークの帰属の番号は下記式(17)の通りである。

(17)



(b) の物性

分子量 724

MS m/z 723 [M - H⁺] ⁻ , 361 [M - 2H⁺] ²⁻

MS/MS m/z 97 [HSO₄]⁻、175 [不飽和D-グルクロン酸-H⁺]⁻、243 [L-フコース硫酸-H⁺]⁻、321 [M-SO₃-2H⁺]²⁻、405 [M-不飽和D-グルクロン酸-2SO₃-H⁺]⁻、417 [M-L-フコース-2SO₃-H⁺]⁻

¹H-NMR (D₂O)

δ 5.66 (1H, d, J=3.4Hz, 4"-H)、5.27 (1H, d, J=7.3Hz, 1"-H)、5.25 (1H, d, J=1.8Hz, 1'-H)、5.21 (1H, d, J=3.7Hz, 1'-H)、4.50 (1H, d, J=3.1Hz, 4'-H)、4.32 (1H, q, J=6.7Hz, 5'-H)、4.27 (1H, d-d, J=3.7, 10.4Hz, 2'-H)、4.21 (1H, d-d, J=3.4, 6.7Hz, 3"-H)、4.18 ((1H, d-d, J=1.8, 11.0Hz, 5-CHのH)、4.15 (1H, br-s, 2-H)、4.10 (1H, d-d, J=5.8, 11.0Hz, 5-CHのH)、3.99 (1H, d-d, J=3.1, 10.4Hz, 3'-H)、3.90 (1H, m, 5-H)、3.82 (1H, m, 3-H)、3.82 (1H, m, 4-H)、3.54 (1H, br-t, J=7.3Hz, 2"-H)、1.11 (3H, d, J=6.7Hz, 5'-CH₃のH₃)

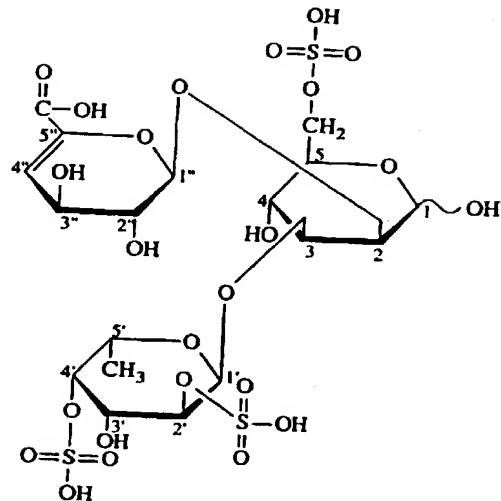
糖組成 L-フコース：不飽和D-グルクロン酸：D-マンノース=1:1:1

(各1分子)

硫酸基 3分子 (L-フコースの2位と4位及びD-マンノースの6位)

なお、¹H-NMRにおけるピークの帰属の番号は下記式(18)の通りである。

(18)



(c) の物性

分子量 1128

MS m/z 1127 [$M - H^+$] $-$

MS/MS m/z 97 [$H_2SO_4^-$] $-$ 、175 [不飽和D-ヘキスロン酸- H^+] $-$ 、225 [L-フコース硫酸- $H_2O - H^+$] $-$ 、243 [L-フコース硫酸- H^+] $-$ 、371 [$M - 不飽和D-グルクロン酸-L-フコース-SO_3^- - 2H^+$] $^{2-}$ 、405 [硫酸化L-フコースとD-マンノースが結合したもの- H^+] $-$ 、721 [$M - D-マンノース-L-フコース-SO_3^- - H_2O - H^+$] $-$]

 1H -NMR (D_2O)

δ 5.69 (1H, d, $J = 3.7\text{ Hz}$, (4) $''$ -H)、5.34 (1H, s, (1)-H)、5.16 (1H, s, 1-H)、5.10 (1H, d, $J = 4.0\text{ Hz}$, (1)'-H)、5.05 (1H, d, $J = 3.7\text{ Hz}$, 1'-H)、4.93 (1H, d, $J = 6.4\text{ Hz}$, (1) $''$ -H)、4.50 (1H, d-d, $J = 3.4, 10.7\text{ Hz}$, 3'-H)、4.47 (1H, d-d, J)

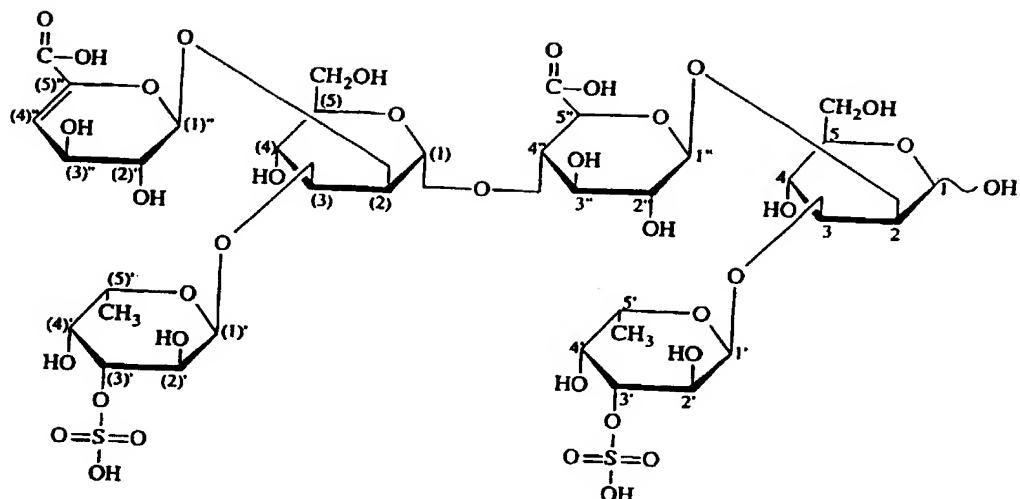
= 3. 4, 10, 4 Hz, (3) ' -H)、4, 39 (1 H, d, J = 7, 9 Hz, 1" -H)、4, 33 (1 H, br-s, (2) -H)、4, 14 (1 H, m, 2 -H)、4, 12 (1 H, m, (3) " -H)、4, 12 (1 H, m, 5 ' -H)、4, 12 (1 H, m, (5) ' -H)、4, 04 (1 H, m, 4' -H)、4, 03 (1 H, m, (4) ' -H)、3, 85 (1 H, m, 2' -H)、3, 85 (1 H, m, (2) ' -H)、3, 82 (1 H, m, 3 -H)、3, 82 (1 H, m, (3) -H)、3, 73 (1 H, m, 4 -H)、3, 73 (1 H, m, 5 -CH₂ の H₂)、3, 70 (2 H, m, (5) -CH₂ の H₂)、3, 67 (1 H, m, 5" -H)、3, 62 (1 H, m, 4" -H)、3, 62 (1 H, m, (2) " -H)、3, 62 (1 H, m, (5) -H)、3, 51 (1 H, t, J = 8, 9 Hz, 3" -H)、3, 28 (1 H, t, J = 7, 9 Hz, 2" -H)、1, 09 (3 H, d, J = 6, 7 Hz, (5) ' -CH₃ の H₃)、1, 07 (1 H, d, J = 6, 7 Hz, 5' -CH₃ の H₃)

糖組成 L-フコース：不飽和D-グルクロン酸：D-グルクロン酸：D-マンノース = 2 : 1 : 1 : 2 (L-フコースとD-マンノース各2分子と不飽和D-グルクロン酸とD-グルクロン酸各1分子)

硫酸基 2分子 (各L-フコースの3位)

なお、¹H-NMRにおけるピークの帰属の番号は下記式(19)の通りである。

(19)



(d) の物性

分子量 1062

MS m/z 1061 [M-H⁺] -

MS/MS m/z 97 [HSO₄] - , 175 [不飽和ヘキスロン酸-H⁺] - , 225 [L-フコース硫酸-H₂O-H⁺] - , 243 [L-フコース硫酸-H⁺] - , 405 [L-フコースとD-マンノースと硫酸基が結合したもの-H⁺] - , 450 [M-2SO₃-2H⁺] ²⁻ , 490 [M-SO₃-2H⁺] ²⁻

¹ H-NMR (D₂O)

δ 5.67 (1H, d, J=3.7Hz, (4')-H) , 5.32 (1H, br-s, (1)-H) , 5.17 (1H, d, J=3.5Hz, 1'-H) , 5.17 (1H, br-s, 1-H) , 4.93 (1H, d, J=6.4Hz, (1')-H) , 4.71 (1H, m, 1''-H) , 4.53 (1H, d, J=3.4Hz, 4'-H) , 4.33 (1H, q, J=6.7Hz, 5'-H) ,

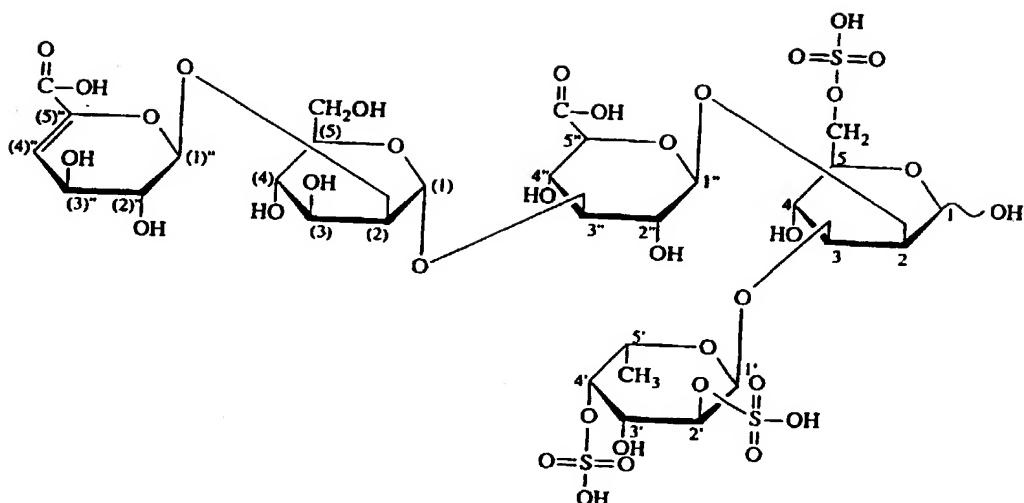
4. 28 (1H, d-d, J=3. 5, 11. 0 Hz, 2' -H)、4. 18 (1H, m, 5-CH₂ のH)、4. 13 (1H, m, (2) -H)、4. 12 (1H, m, (3) " -H)、4. 08 (1H, m, 5-CH₂ のH)、4. 07 (1H, m, 2-H)、3. 98 (1H, d-d, J=3. 4, 11. 0, 3' -H)、3. 88 (1H, m, 5-H)、3. 82 (1H, m, 4" -H)、3. 78 (1H, m, 3-H)、3. 78 (1H, m, 4-H)、3. 78 (1H, m, (3) -H)、3. 67 (2H, m, (5) -CH₂ のH₂)、3. 63 (1H, m, (2) " -H)、3. 60 (1H, m, 3" -H)、3. 59 (1H, m, 5" -H)、3. 57 (1H, m, (4) -H)、3. 57 (1H, m, (5) -H)、3. 16 (1H, t, J=7. 9 Hz, 2" -H)、1. 10 (3H, d, J=6. 7 Hz, 5' -CH₃ のH₃)

糖組成 L-フコース：不飽和D-グルクロン酸：D-グルクロン酸：D-マンノース=1：1：1：2 (L-フコースと不飽和D-グルクロン酸とD-グルクロン酸各1分子とD-マンノース2分子)

硫酸基 3分子 (L-フコースの2位と4位及び還元性末端側のD-マンノースの6位)

なお、¹H-NMRにおけるピークの帰属の番号は下記式(20)の通りである

(20)



(e) の物性

分子量 1448

MS m/z 767 [M + 4Na - 6H⁺] ²⁻503.7 [M + 3Na - 6H⁺] ³⁻366.5 [M + Na - 5H⁺] ⁴⁻

MS/MS m/z 97 [HSO₄]⁻, 225 [L-フコース硫酸-H₂O-H⁺]⁻, 243 [L-フコース硫酸-H⁺]⁻, 345 [L-フコースジ硫酸+Na-2H⁺]⁻, 450 [M+3Na-2SO₃-6H⁺]³⁻, 477 [M+3Na-SO₃-6H⁺]³⁻, 563 [不飽和D-グルクロン酸とD-マンノースとL-フコースと硫酸が結合したもの-H⁺]⁻, 705 [不飽和D-グルクロン酸とD-マンノース硫酸とL-フコースジ硫酸が結合したもの-H₂O-H⁺]⁻

¹H-NMR (D₂O)

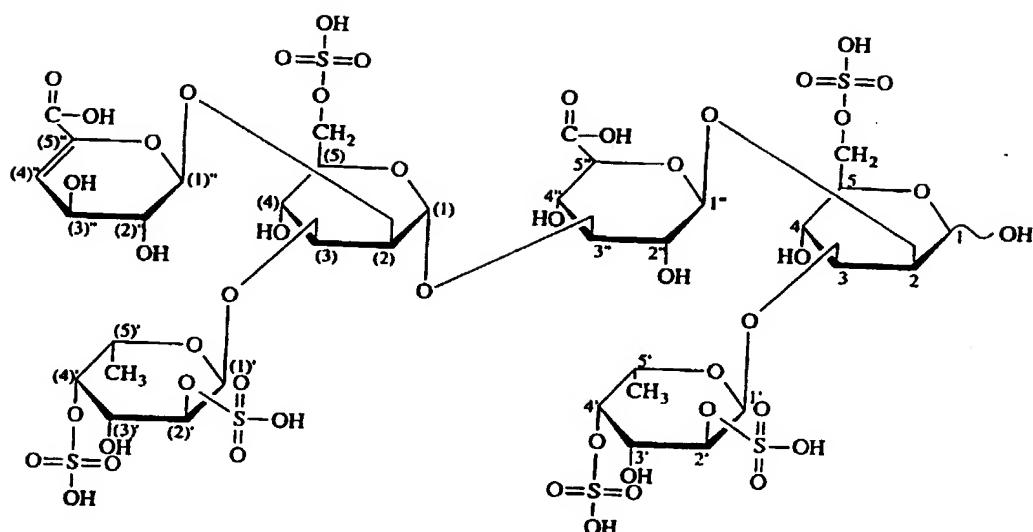
δ 5.58 (1H, d, J=3.4Hz, (4) \sim -H)、5.35 (1H, br-s, (1) -H)、5.22 (1H, d, J=6.7Hz, (1) \sim -H)、5.19 (1H, d, J=3.7Hz, 1' -H)、5.19 (1H, d, J=3.7Hz, (1)' -H)、5.16 (1H, d, J=1.8Hz, 1-H)、4.62 (1H, d, J=7.6Hz, 1'' -H)、4.50 (1H, m, 4' -H)、4.50 (1H, m, (4)' -H)、4.30 (1H, m, 5' -H)、4.30 (1H, m, (5)' -H)、4.30 (1H, m, (5)-CH₂ のH)、4.25 (1H, m, 2' -H)、4.25 (1H, m, (2)-H)、4.25 (1H, m, (2)' -H)、4.20 (1H, m, (5)-CH₂ のH)、4.18 (1H, m, 5-CH₂ のH)、4.16 (1H, m, (3) \sim -H)、4.08 (1H, m, 5-CH₂ のH)、4.07 (1H, m, 2-H)、4.02 (1H, m, 3' -H)、4.02 (1H, m, (3)' -H)、3.85 (1H, m, 5-H)、3.85 (1H, m, (5)-H)、3.78 (1H, m, 3-H)、3.78 (1H, m, (3)-H)、3.76 (1H, m, 5'' -H)、3.75 (1H, m, 4-H)、3.75 (1H, m, (4)-H)、3.58 (1H, m, 3 \sim -H)、3.55 (1H, m, (2) \sim -H)、3.18 (1H, t, J=8.2Hz, 2'' -H)、1.10 (3H, d, J=6.7Hz, (5)' -CH₃ のH₃)、1.09 (3H, d, J=6.7Hz, 5' -CH₃ のH₃)

糖組成 L-フコース：不飽和D-グルクロン酸：D-グルクロン酸：D-マンノース=2：1：1：2 (L-フコースとD-マンノース各2分子と不飽和D-グルクロン酸とD-グルクロン酸各1分子)

硫酸基 6分子 (各L-フコースの2位と4位及び各D-マンノースの6位)
なお、¹H-NMRにおけるピークの帰属の番号は下記式(21)の通りである

。

(21)



(f) の物性

分子量 644

MS m/z 687 [M + 2Na - 3H⁺] -MS/MS m/z 97 [HSO₄] - , 243 [L-フコース硫酸 - H⁺] - , 421 [不飽和D-グルクロン酸とD-マンノース硫酸 + Na - H₂O - 2H⁺] -¹H-NMR (D₂O)

δ 5.60 (1H, d, J = 3.4 Hz, 4'' - H) , 5.24 (1H, br-s, 1 - H) , 5.08 (1H, d, J = 4.0 Hz, 1' - H) , 4.94 (1H, d, J = 6.7 Hz, 1'' - H) , 4.45 (1H, d-d, J = 3.1, 1.10, 4 Hz, 3' - H) , 4.20 (1H, br-s, 2 - H) , 4.14 (1H, m, 5' - H) , 4.09 (1H, m, 3'' - H) , 4.01 (1H, d, J = 3.1 Hz, 4' - H)

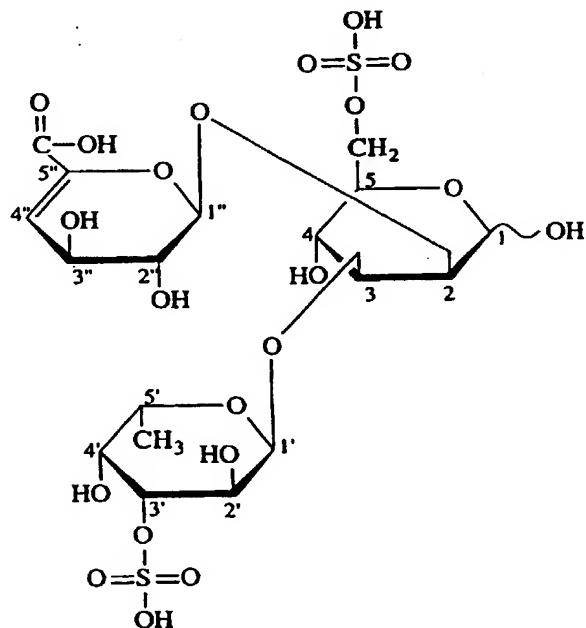
)、3.91 (1H, m, 5-H)、3.85 (1H, m, 3-H)、3.85
 (1H, m, 2'-H)、3.75 (1H, t, J=9.8Hz, 4-H)、3
 .59 (1H, t, J=6.7Hz, 2''-H)、1.06 (3H, d, J=6
 .4Hz, 5'-CH₃のH₃)

糖組成 L-フコース：不飽和D-グルクロン酸：D-マンノース=
 1:1:1 (L-フコースとD-マンノースと不飽和D-グルクロン酸各1分
 子)

硫酸基 2分子 (L-フコースの3位及びD-マンノースの6位)

なお、¹H-NMRにおけるピークの帰属の番号は下記式(22)の通りであ
 る。

(22)



(g) の物性

分子量 632

MS m/z 631 [M-H⁺] -

MS/MS m/z 405 [D-ガラクトースとL-フコース硫酸が結合したもの-H⁺] -、551 [L-フコース硫酸とL-フコースとD-ガラクトースが結合したもの-H⁺] -

¹ H-NMR (D₂O)

δ 5.15 (1H, d, J=4.3Hz, F₁ 1-H)、4.93 (1H, d, J=3.7Hz, F₂ 1-H)、4.53 (1H, d-d, J=2.4, 1.0, 4Hz, F₁ 3-H)、4.49 (1H, d, J=7.6Hz G₁ 1-H)、4.46 (1H, d-d, J=3.1, 1.10, 7Hz, F₂ 3-H)、4.36 (1H, q, J=6.7Hz F₂ 5-H)、4.14 (1H, q, J=6.7Hz F₁ 5-H)、4.09 (1H, d, J=2.4Hz F₁ 4-H)、4.03 (1H, d, J=3.1Hz F₂ 4-H)、3.97 (1H, d-d, J=4.3, 1.10, 4Hz, F₁ 2-H)、3.90 (1H, br-s, G₁ 4-H)、3.81 (1H, d-d, J=3.7, 1.10, 7Hz, F₂ 2-H)、3.59 (1H, m, G₁ 3-H)、3.59 (1H, m, G₁ 5-H)、3.59 (2H, m, G₁ 5-CH₂ のH₂)、3.56 (1H, m, G₁ 2-H)、1.19 (3H, d, J=6.7Hz, F₁ 5-CH₃ のH₃)、1.14 (3H, d, J=6.7Hz, F₂ 5-CH₃ のH₃)

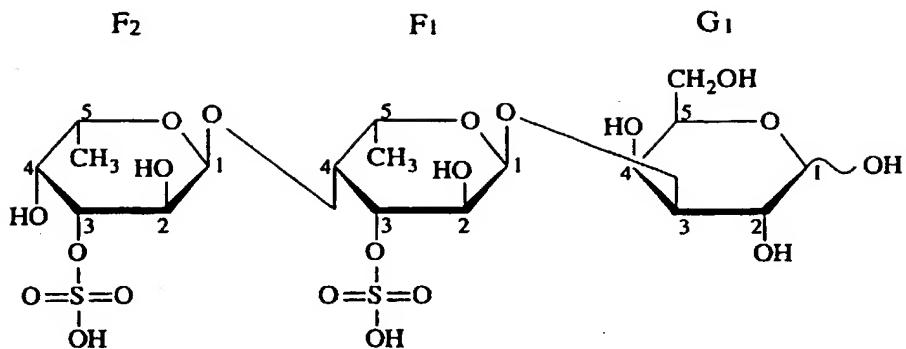
糖組成 L-フコース:D-ガラクトース= 2:1

(L-フコース2分子とD-ガラクトース1分子)

硫酸基 2分子 (各L-フコースの3位)

なお、¹ H-NMRにおけるピークの帰属の番号は下記式(23)の通りである

(23)



(h) の物性

分子量 1358

MS m/z 1445 [M + 4 Na - 5 H⁺] -MS/MS m/z 97 [HSO₄] - , 225 [L-フコース硫酸 - H₂O - H⁺] - , 1197 [M - 2SO₃ - H⁺] -¹H-NMR (D₂O)

δ 5.19 (1H, d, J=4.3Hz, F₁, 1-H)、4.93 (1H, d, J=3.7Hz, F₂, 1-H)、4.62 (1H, m, G₂, 1-H)、4.59 (1H, m, G₁, 1-H)、4.54 (1H, d-d, J=2.7, 10.6Hz, F₁, 3-H)、4.46 (1H, m, F₂, 3-H)、4.46 (1H, d, J=7.6Hz, G₂, 1-H)、4.41 (1H, br-s, G₁, 4-H)、4.41 (1H, d, J=7.6Hz, G₄, 1-H)、4.37 (1H, q, J=6.4Hz, F₂, 5-H)、4.27 (1H, m, G₁, 3-H)、4.24 (1H, br-s, G₃, 4-H)、4.21 (1H, m, G₃, 3-H)、4.19 (1H, m, G₄, 3-H)、4.15 (1H, br-s, G₄, 4-H)、4.13 (1H, q, J=6.7Hz, F₁, 5-H)、4.09 (1H, d, J=2.

7 Hz, F₁ 4-H)、4.04 (1H, d, J=2.8 Hz, F₂ 4-H)、
 3.98 (1H, m, G₁ 5-CH₂ の H)、3.96 (1H, d-d, J=4
 . 3.10. 6 Hz, F₁ 2-H)、3.88 (1H, br-s, G₂ 4-H)
 、3.93 (1H, m, G₃ 5-CH₂ の H)、3.86 (1H, m, G₁ 5-
 H)、3.81 (1H, m, F₂ 2-H)、3.81 (1H, m, G₁ 5-CH
₂ の H)、3.80 (1H, m, G₃ 5-H)、3.80 (1H, m, G₃ 5-
 CH₂ の H)、3.66 (1H, m, G₂ 3-H)、3.65 (1H, m, G₁
 2-H)、3.64 (1H, m, G₂ 5-CH₂ の H)、3.64 (1H, m,
 G₄ 5-CH₂ の H)、3.61 (1H, m, G₄ 5-H)、3.58 (1H,
 m, G₂ 2-H)、3.56 (1H, m, G₂ 5-CH₂ の H)、3.56 (1
 H, m, G₄ 5-CH₂ の H)、3.55 (1H, m, G₄ 2-H)、3.54
 (1H, m, G₂ 5-H)、3.54 (1H, m, G₃ 2-H)、1.20 (3
 H, d, J=6.7 Hz, F₁ 5-CH₃ の H₃)、1.14 (3H, d, J=
 6.4 Hz, F₂ 5-CH₃ の H₃)

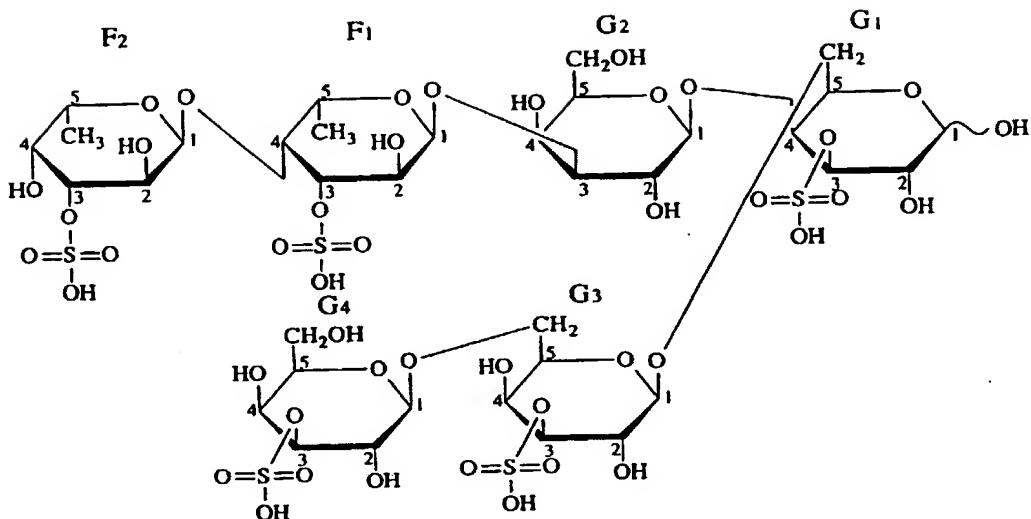
糖組成 L-フコース:D-ガラクトース=1:2

(L-フコース2分子とD-ガラクトース4分子)

硫酸基 5分子 (各L-フコースの3位、還元性末端のD-ガラクトースの3位
 、及び還元性末端のD-ガラクトースの6位に結合したD-ガラクトースの3位
 、及びそのD-ガラクトースの6位に結合したD-ガラクトースの3位)

なお、¹H-NMRにおけるピークの帰属の番号は下記式(24)の通りであ
 る。

(24)



(i) の物性

分子量 1288

MS m/z 1149 $[M + Na - 2SO_3 - 2H^+]^-$ MS/MS m/z 97 $[HSO_4]^-$ 、345 [L-フコースジ硫酸+Na
- 2H⁺]^-¹H-NMR (D₂O)

δ 5.68 (1H, d, J=3.4Hz, (4)'-H)、5.34 (1H, br-s, (1)'-H)、5.19 (1H, m, 1'-H)、5.19 (1H, m, (1)-H)、4.94 (1H, m, 1'-H)、4.94 (1H, d, J=6.4Hz, (1)"-H)、4.72 (1H, d, J=7.9Hz, 1"-H)、4.54 (1H, m, (4)'-H)、4.48 (1H, d-d, J=3.3, 10.6Hz, 3'-H)、4.38 (1H, q, J=6.4Hz, 5'-H)、4.34 (1H, q, J=6.7Hz, (5)'-H)、4.29 (1H, m, (2)'-H)、4.20 (1H, m, 5-CH₂のH)、4.14 (

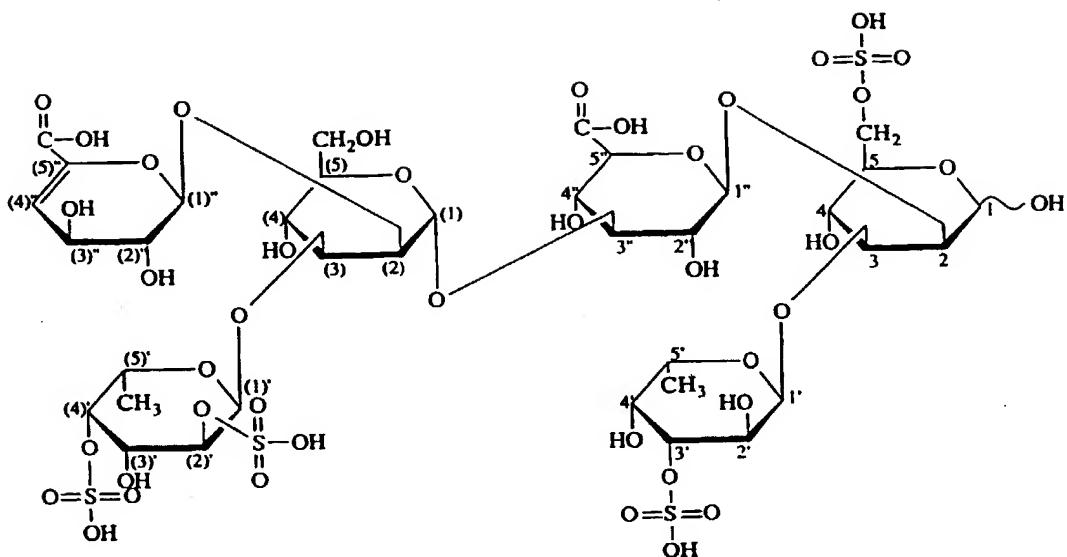
1 H, m, (2) -H)、4.13 (1 H, m, (3)'' -H)、4.09 (1 H, m, 5-CH₂ のH)、4.08 (1 H, m, 2-H)、4.05 (1 H, d, J=3.3 Hz, 4' -H)、3.99 (1 H, m, (3)' -H)、3.89 (1 H, m, 5-H)、3.83 (1 H, m, 4'' -H)、3.81 (1 H, m, 2' -H)、3.80 (1 H, m, 4-H)、3.78 (1 H, m, 3-H)、3.78 (1 H, m, (3) -H)、3.68 (2 H, m, (5) -CH₂ のH₂)、3.62 (1 H, m, (2)'' -H)、3.60 (1 H, m, 3'' -H)、3.60 (1 H, m, 5'' -H)、3.58 (1 H, m, (5) -H)、3.56 (1 H, m, (4) -H)、3.17 (1 H, t, J=7.9 Hz, 2'' -H)、1.15 (3 H, d, J=6.4 Hz, 5' -CH₃ のH₃)、1.11 (3 H, d, J=6.7 Hz, (5)' -CH₃ のH₃)

糖組成 L-フコース：不飽和D-グルクロン酸：D-グルクロン酸：D-マンノース=2：1：1：2 (L-フコースとD-マンノース各2分子と不飽和D-グルクロン酸とD-グルクロン酸各1分子)

硫酸基 4分子 (還元性末端のD-マンノースに結合したL-フコースの3位ともう一方のL-フコースの2位と4位及び還元性末端側のD-マンノースの6位)

なお、¹H-NMRにおけるピークの帰属の番号は下記式(25)の通りである。

(25)



また、本発明の第1の発明である糖化合物は、本発明の第3の発明であるフコイダノバクター属に属する細菌から得られる菌体抽出物又は培養液上清をフコイダンに作用させた場合にも製造することができる。

本発明の第3の発明である菌株としては、フコイダノバクター属に属する本発明の菌株であればいかなる菌株でも良く、該菌株の具体例としては、例えば、フコイダノバクター・マリナス (*Fucoidanobacter marinus*) S I - 0098 株が挙げられる。

本菌株は青森県の海水中より本発明者らが新たに検索して得た菌株で、その菌学的性質は次の通りである。

2. フコイダノバクター マリナス S I - 0098

a. 形態的性質

(1) 本菌は球～短桿菌であり、時に双球菌の形態をとることがある。

幅 0.5~0.7 μm

長さ 0.5~0.7 μm

(2) 胞子の有無 なし

(3) グラム染色性 陰性

b. 生理的性質

(1) 生育の温度範囲

37°Cで生育できる。好適な生育温度は15~28°Cである。

(2) 酸素に対する態度 好気性

(3) カタラーゼ 陽性

(4) オキシダーゼ 陰性

(5) ウレアーゼ 陰性

(6) 加水分解

デンプン 陽性

ゼラチン 陰性

カゼイン 陰性

エスクリン 陽性

(7) 硝酸塩の還元 陰性

(8) インドールの生成 陰性

(9) 硫化水素の生成 陽性

(10) ミルクの凝固 陰性

(11) ナトリウムの要求性 陽性

(12) 塩類要求性

0%食塩培地での生育 陰性

1%食塩培地での生育 陰性

海水培地での生育 陽性

(13) キノン系 メナキノン7

(14) 菌体内DNAのGC含量 61%

- (15) 細胞壁のジアミノピメリン酸 陰性
 (16) グリコリル試験 陰性
 (17) ヒドロキシ脂肪酸の存在 陽性
 (18) OF-テスト 〇
 (19) 集落の色調 特徴的な集落色素を生成せず
 (20) 運動性 あり
 (21) 滑走性 なし
 (22) 鞭毛 極単毛

本菌株は、バージーズ マニュアル オブ ディターミネイティブ バクテリオロジー、第9巻（1994）記載の基本分類によればグループ4（グラム陰性オロジー、好気性かん菌及び球菌）に分類される。しかしながら本菌株は、電子伝達鎖にメナキノン7を有し、GC含量が61%の点でグループ4に属する菌と大いに異なる。基本的にグラム陰性細菌は電子伝達鎖にユビキノンを有し、グラム陽性細菌はメナキノンを有している。

グラム陰性細菌であるフラボバクテリウム属及びシトファーガ (*Cytophaga*) 属は例外的に電子伝達鎖にメナキノンを有しているが、これらの属に属する細菌のGC含量は、土壤細菌であるシトファーガ アーベンシコラ (*Cytophaga arvensicola*) が43~46%、海洋細菌であるシトファーガ ジフルエンス (*Cytophaga diffluens*)、シトファーガ フermenans (*Cytophaga fermentans*)、シトファーガ マリーナ (*Cytophaga marina*)、及びシトファーガ -ウリギノーサ (*Cytophaga uliginosa*) が42%であり、本菌株の性質とは全く異なる。更に、本菌株と既同定株の16S rDNA配列の相同意を比較したところ、最も相同意の高い既同定株ベルコミクロビウム スピノサム (*Verrucomicrobium spinosum*)においてもその相同意は、76.6%であった。16S rDNA配列の相同意が90%以下の場合、両細菌の属が異なることは一般に広く知られていることから

、本発明者らは、本菌株は既存の属に属さない新属の細菌であると断定し、よつて本菌株をフコイダノバクター マリナス SI-0098と命名した。

なお、上記菌株は *Fucoidanobacter marinus* SI-0098と表示され、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所【あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305）】にFERM BP-5403（原寄託日：平成7年3月29日、国際寄託日への移管請求日：平成8年2月15日）として寄託されている。

本発明の第3の発明であるフコイダノバクター属細菌を培養し、その菌体抽出物、又は培養液上清をフコイダンに作用させることにより、本発明の第1の発明の糖化合物を遊離させることができる。培養する菌株としては、フコイダノバクター属に属し、その菌体抽出物又は培養液上清をフコイダンに作用させた場合、本発明の第1の発明である糖化合物が得られる菌株であればいかなる菌株でも良く、該菌株の具体例としては、例えば、*Fucoidanobacter marinus* SI-0098株が挙げられる。

フコイダノバクター属細菌株の培地に加える栄養源は該菌株が利用し、該菌株がフコイダンから本発明の第1の発明である糖化合物の生成が可能な菌体内抽出物及び培養上清を生産するものであればよく、炭素源としては例えばフコイダン、海藻粉末、アルギン酸、フコース、グルコース、マンニトール、グリセロール、サッカロース、マルトース、ラクトース、デンプン等が利用でき、窒素源としては、酵母エキス、ペプトン、カザミノ酸、コーンスティーブリカー、肉エキス、脱脂大豆、硫安、塩化アンモニウム等が適当である。その他にナトリウム塩、リン酸塩、カリウム塩、マグネシウム塩、亜鉛塩等の無機質、及び金属塩類を加えてよい。

また本菌株は上記栄養源を含んだ海水あるいは人工海水中で非常に良く生育する。

本発明の第3の発明であるフコイダノバクター属細菌を培養するに当り、一般に培養温度は、15°C~30°C、培地のpHは5~9がよく、5~72時間の通気かくはん培養で、該菌株の菌体内抽出物及び培養上清のエンド型フコイダン分解酵素活性は最大に達する。培養条件は使用する菌株、培地組成に応じ、該菌株が生産する菌体内抽出物及び培養上清のエンド型フコイダン分解活性が最大になるように設定することは当然のことである。

フコイダノバクター属 S1-0098株を適当な培地で培養し、培養終了後、遠心分離すれば菌体及び培養液上清が得られる。更に得られた菌体を通常用いられる細胞破壊手段、例えば、超音波破碎後、遠心分離すれば菌体抽出液が得られる。

限外ろ過により濃縮した培養液上清又は菌体抽出液を塩化ナトリウムを含むリン酸緩衝液と混合し、これにフコイダンを加え、反応させる。

反応終了後、反応液を分子量分画用のカラムを用いて分画することにより本発明の第1の発明である糖化合物を得ることができる。

本発明の第1の発明である糖化合物は糖鎖工学用試薬として有用であり、特公平5-65108号記載の方法によりPA化を行い、PA化物を調製すれば、糖鎖工学用試薬として極めて有用な物質が提供される。更に本発明の糖化合物は抗ガン剤、癌転移抑制剤、抗ウィルス剤としての生理活性の適用が期待される。

本発明を実施するための最良の形態

以下に、本発明の第1の発明である糖化合物の例の製造方法を実施例をもって示すが本発明が以下の実施例の範囲のみに限定されるものではない。

実施例1

フラボバクテリウム sp. SA-0082 (FERM BP-5402) を、グルコース0.1%、ペプトン1.0%、酵母エキス0.05%を含む人工海水(ジャマリンラボラトリ一製) pH 7.5からなる培地600mLを分注して殺菌

した(120℃、20分)2リットルの三角フラスコに接種し、24℃で20時間培養して種培養液とした。ガゴメ昆布由来のフコイダン0.3%、ペプトン0.5%、酵母エキス0.01%、及び消泡剤(信越化学工業製KM70)0.01%を含む人工海水(ジャマリンラボラトリ一製)pH7.5からなる培地20リットルを30リットル容のジャーファーメンターに入れ120℃で20分殺菌した。冷却後、上記の種培養液600mlを接種し、24℃で20時間、毎分10リットルの通気量と毎分125回転のかくはん速度の条件で培養した。培養終了後、培養液を遠心分離して菌体及び培養液上清を得た。

この培養液上清を限外ろ過(ろ過膜の排除分子量1万)(アミコン社製)により濃縮し、本発明のエンド型フコイダン分解酵素を測定したところ培養液1ml当たり6ミリユニットの活性が検出された。

一方、本培養で得られた菌体を、200mMの食塩を含む20mMの酢酸-リン酸緩衝液(pH7.5)に懸濁し、超音波破碎後、遠心分離して菌体抽出液を得た。この菌体抽出液中の本発明のエンド型フコイダン分解酵素の活性を測定したところ、培地1ml中に20mUの活性が検出された。

上記の培養液上清の濃縮液に、終濃度が90%飽和となるように硫酸アンモニウムを加え、かくはん溶解後遠心分離し、沈殿を上記菌体抽出液と同じ緩衝液に懸濁して、50mMの食塩を含む20mMの酢酸-リン酸緩衝液(pH7.5)で十分透析した。透析により生じた沈殿を遠心分離により除去後、あらかじめ50mMの食塩を含む20mMの酢酸-リン酸緩衝液(pH7.5)で平衡化したDEAE-セファロースFFのカラムに吸着させ、吸着物を同緩衝液にて十分洗浄後、50mMから600mMの食塩のグラジェントにより溶出させ、活性画分を集めた。次にこの活性画分に終濃度が4Mとなるように食塩を加え、あらかじめ4Mの食塩を含む20mMのリン酸緩衝液(pH8.0)で平衡化したフェニルセファロースCL-4Bのカラムに吸着させ、吸着物を同緩衝液で十分洗浄

後、4Mから1Mの食塩のグラジェントにより溶出させ、活性画分を集めた。次にこの活性画分を限外ろ過器（アミコン社製）で濃縮後、あらかじめ50mM食塩を含む10mMリン酸緩衝液で平衡化したセファクリル S-200でゲルろ過を行い活性画分を集めた。次にこの活性画分に終濃度が3.5Mとなるように食塩を加え、あらかじめ3.5Mの食塩を含む10mMリン酸緩衝液（pH 8）で平衡化したフェニルセファロース HPのカラムに吸着させ、吸着物を同緩衝液で洗浄後、3.5Mから1.5Mの食塩のグラジェントにより溶出させ、活性画分を集めて精製酵素を得た。この酵素の分子量をセファクリル S-200の保持時間から求めたところ約7万であった。以上の精製工程を表1に示す。

表 1

工 程	総タンパク量 (mg)	総活性 (ミリ単位)	比活性 (ミリ単位/mg)	収率 (%)
培養液上清	980	114,000	116	100
硫安塩析	473	108,000	228	94.7
DEAE-セファロース FF	216	86,400	400	75.8
フェニルセファロース CL-4B	21.9	57,300	2,620	50.3
セファクリル S-200	3.70	46,200	12,500	40.5
フェニルセファロース HP	1.53	41,200	27,000	36.1

実施例2

フラボバクテリウム sp. SA-0082 (FERM BP-5402) をグルコース0.25%、ペプトン1.0%、酵母エキス0.05%を含む人工海水（ジャマリンラボラトリー製）pH 7.5からなる培地600mlを分注して殺菌した(120°C、20分) 2リットルの三角フラスコに接種し、24°Cで24時

間培養して種培養液とした。グルコース0.25%、ペプトン1.0%、酵母エキス0.05%、及び消泡剤（信越化学工業製KM70）0.01%を含む人工海水（ジャマリンラボラトリ一製）pH7.5からなる培地20リットルを30リットル容のジャーファーメンターに入れ120℃で20分殺菌した。冷却後、上記の種培養液600mlを接種し、24℃で24時間、毎分10リットルの通気量と毎分125回転のかくはん速度の条件で培養した。培養終了後、培養液を遠心分離して菌体及び培養液上清を得た。

この培養液上清を限外ろ過（ろ過膜の排除分子量1万）（アミコン社製）により濃縮し、本発明のエンド型フコイダン分解酵素を測定したところ培養液1ml当たり1mUの活性が検出された。

一方、本培養で得られた菌体を、200mMの食塩を含む20mMの酢酸-リン酸緩衝液（pH7.5）に懸濁し、超音波破碎後、遠心分離して菌体抽出液を得た。この菌体抽出液中の本発明のエンド型フコイダン分解酵素の活性を測定したところ、培地1ml中に5mUの活性が検出された。

本抽出液に、終濃度が90%飽和となるように硫酸アンモニウムを加え、かくはん溶解後遠心分離し、沈殿を上記菌体抽出液と同じ緩衝液に懸濁して、50mMの食塩を含む20mMの酢酸-リン酸緩衝液（pH7.5）で十分透析した。透析により生じた沈殿を遠心分離により除去後、あらかじめ50mMの食塩を含む20mMの酢酸-リン酸緩衝液（pH7.5）で平衡化したDEAE-セファロースFFのカラムに吸着させ、吸着物を同緩衝液にて十分洗浄後、50mMから600mMの食塩のグラジエントにより溶出させ、活性画分を集めた。次にこの活性画分に終濃度が4Mとなるように食塩を加え、あらかじめ4Mの食塩を含む20mMのリン酸緩衝液（pH8.0）で平衡化したフェニルセファロースCL-4Bのカラムに吸着させ、吸着物を同緩衝液で十分洗浄後、4Mから1Mの食塩のグラジエントにより溶出させ、活性画分を集めた。次にこの活性画分を

限外ろ過器で濃縮後、あらかじめ 50 mM 食塩を含む 10 mM リン酸緩衝液で平衡化したセファクリル S-300 でゲルろ過を行い活性画分を集めた。この酵素の分子量をセファクリル S-300 の保持時間から求めたところ約 46 万であった。次にこの活性画分に 25 mM の食塩を含む 10 mM のリン酸緩衝液 (pH 7) で透析した。この酵素液を、あらかじめ 250 mM の食塩を含む 10 mM のリン酸緩衝液 (pH 7) で平衡化したモノ (Mono) Q HR5/5 のカラムに吸着させ、吸着物を同緩衝液で十分洗浄後、250 mM から 450 mM の食塩のグラジエントにより溶出させ、活性画分を集め、精製酵素を得た。以上の精製工程を表 2 に示す。

表 2

工 程	総タンパク量 (mg)	総活性 (ミリ単位)	比活性 (ミリ単位/mg)	収率 (%)
菌体抽出液	61,900	101,000	1.63	100
硫酸安塩析	33,800	88,600	2.62	87.7
DEAE-セファロース FF	2,190	40,400	18.4	40.0
フェニルセファロース CL-4B	48.2	29,000	601	28.7
セファクリル S-300	7.24	19,600	2,710	19.4
モノ Q	0.824	15,000	18,200	14.9

実施例 3

精製したガゴメ昆布由来のフコイダンに本発明の実施例 1 で得られたエンド型フコイダン分解酵素（菌体内酵素）を作用させ分解物の調製を行った。
すなわち、2.5% のフコイダン溶液 16 mL と、50 mM のリン酸緩衝液 (pH 7.5) 12 mL と 4 M の塩化ナトリウム 4 mL と 32 mU/mL の本発明

のエンド型フコイダン分解酵素溶液8m1を混合し、25℃で48時間反応させた。

反応液をセルロファインGCL-300（生化学工業社製）のカラムにより分子量分画し、分子量2000以下の画分を集め。この画分をマイクロアシライザーグ3（旭化成社製）により脱塩後、DEAE-セファロースFFにより3つの画分に分離した。この結果前記した物質(a)、(b)、(c)をそれぞれ41mg、69mg、及び9.6mg得た。

実施例4

精製したガゴメ昆布由来のフコイダンに本発明の実施例2で得られたエンド型フコイダン分解酵素（菌体外酵素）を作用させ分解物の調製を行った。

すなわち、2.5%のフコイダン溶液16m1と、50mMのリン酸緩衝液(pH7.5)12m1と4Mの塩化ナトリウム4m1と32mU/m1の本発明のエンド型フコイダン分解酵素溶液8m1を混合し、25℃で48時間反応させた。

反応液をセルロファインGCL-300（生化学工業社製）のカラムにより分子量分画し、分子量2000以下の画分を集め。この画分をマイクロアシライザーグ3（旭化成社製）により脱塩後、DEAE-セファロースFFにより3つの画分を分離し、凍結乾燥した。この結果前記した物質(a)、(b)、(c)をそれぞれ40mg、65mg、及び9.2mg得た。

実施例5

フコイダノバクター マリナス SI-0098株(FERM BP-5403)を、ガゴメ昆布由来のフコイダン0.3%、ペプトン0.5%、酵母エキス0.05%、及び消泡剤(信越化学工業製KM70)0.01%を含む人工海水(ジャマリンラボラトリ一製)pH7.5からなる培地600m1を2リットル容の三角フラスコに入れ120℃で20分殺菌した培地に接種し、25℃で48

時間、毎分120回転のかくはん速度の条件で培養した。培養終了後、培養液を遠心分離して菌体及び培養液上清を得た。

この培養液上清を限外ろ過（ろ過膜の排除分子量1万）（アミコン社製）により濃縮し、本発明のエンド型フコイダン分解酵素を測定したところ培養液1m1当たり0.2mU活性が検出された。

一方、本培養で得られた菌体を、200mMの食塩を含む20mMの酢酸-リノ酸緩衝液（pH7.5）に懸濁し、超音波破碎後、遠心分離して菌体抽出液を得た。この菌体抽出液中の本発明のエンド型フコイダン分解酵素の活性を測定したところ、培地1m1中に20mUの活性が検出された。

実施例6

精製したガゴメ昆布由来のフコイダンに本発明の実施例5で得られたフコイダノバクター マリナス SI-0098株の菌体内酵素を作用させ分解物の調製を行った。

すなわち、2.5%のフコイダン溶液16m1と、800mMの塩化ナトリウムを含む100mMのリン酸緩衝液（pH8.0）20m1と20mU/m1の本発明の実施例5で得られたフコイダノバクター マリナス SI-0098株の菌体内酵素溶液4m1を混合し、25°Cで48時間反応させた。

反応液をセルロファインGCL-300のカラムにより分子量分画し、分子量2000以下の画分を集めた。この画分をマイクロアシライザーG3により脱塩後、DEAE-セファロースFFにより3つの画分を分離し、凍結乾燥した。この結果前記した物質(a)、(b)、(c)をそれぞれ38mg、60mg、及び8.2mg得た。

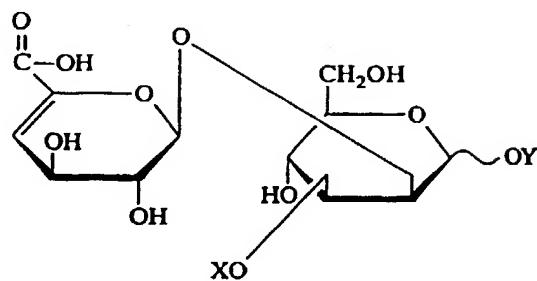
本発明により、フコイダンの構造解析、フコイダンの酵素分解物の同定、及び生物活性の検索に用いることができる糖化合物、フコイダンの部分分解及びフコイダンオリゴ糖の生産などフコイダンに関する研究に有用な新規なエンド型のフ

コイダン分解酵素及び糖化合物の製造に有用な新規微生物が提供された。

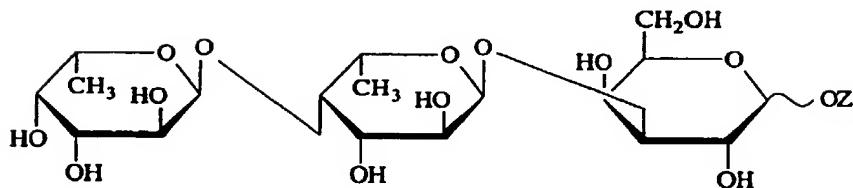
請求の範囲

1. 下記一般式(1)又は(2) :

(1)

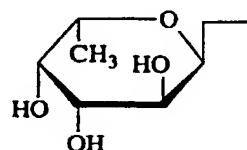


(2)



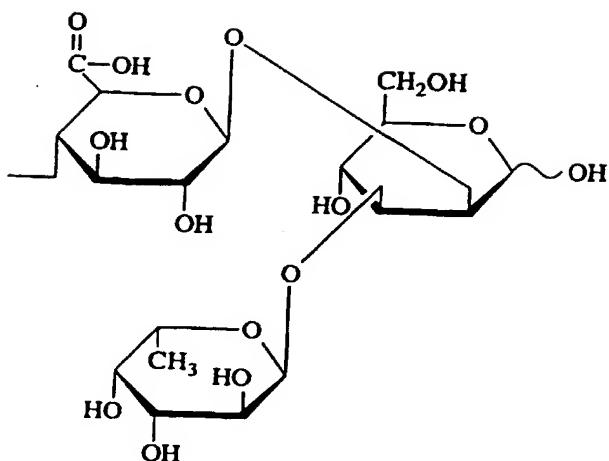
[式中、XはH又は下記式(3) :

(3)

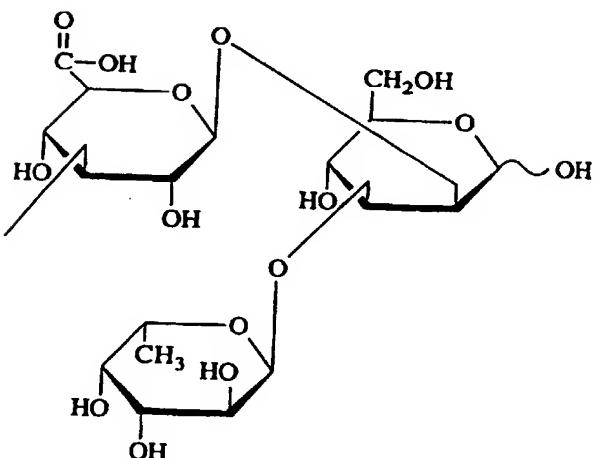


で表される基を示し、YはH又は下記式(4)、若しくは(5) :

(4)

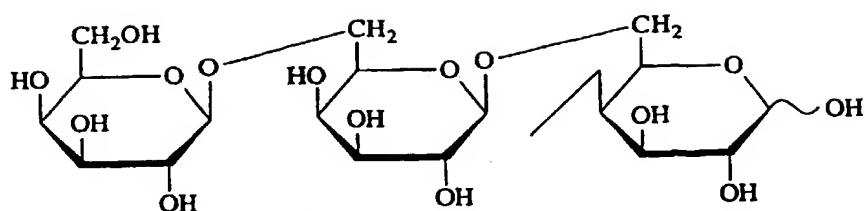


(5)



で表される基を示すが、XとYが共にHであることはない。また、ZはH又は下記式(6)：

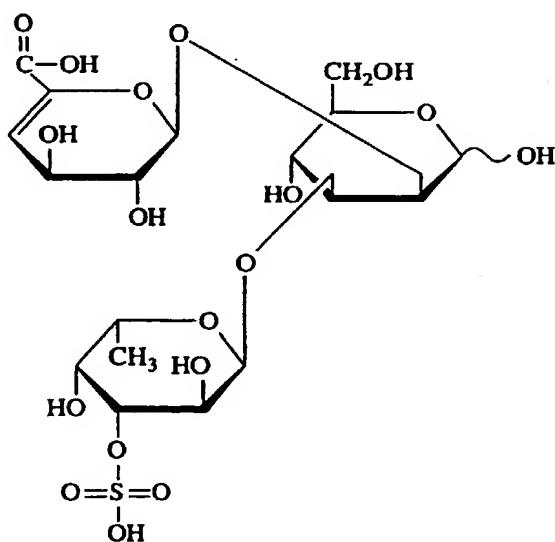
(6)



で表される基を示す] で表される化合物の少なくとも一つのアルコール性水酸基が硫酸エステル化している糖化合物又はその塩。

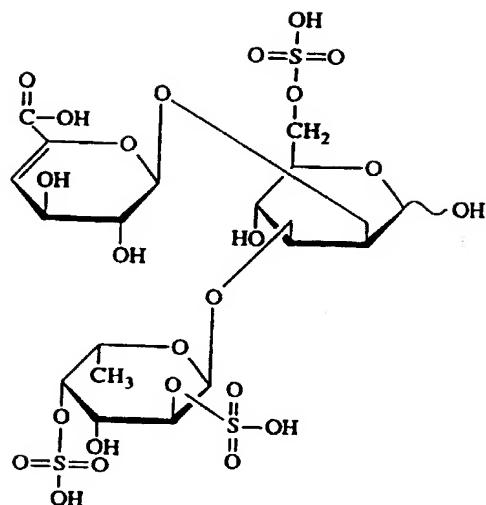
2. 下記式 (7) で表される糖化合物又はその塩。

(7)



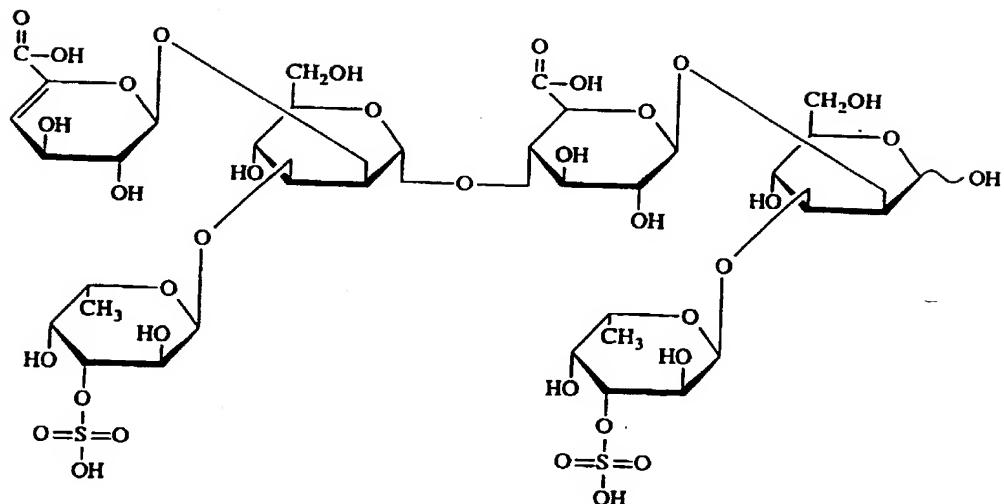
3. 下記式 (8) で表される糖化合物又はその塩。

(8)



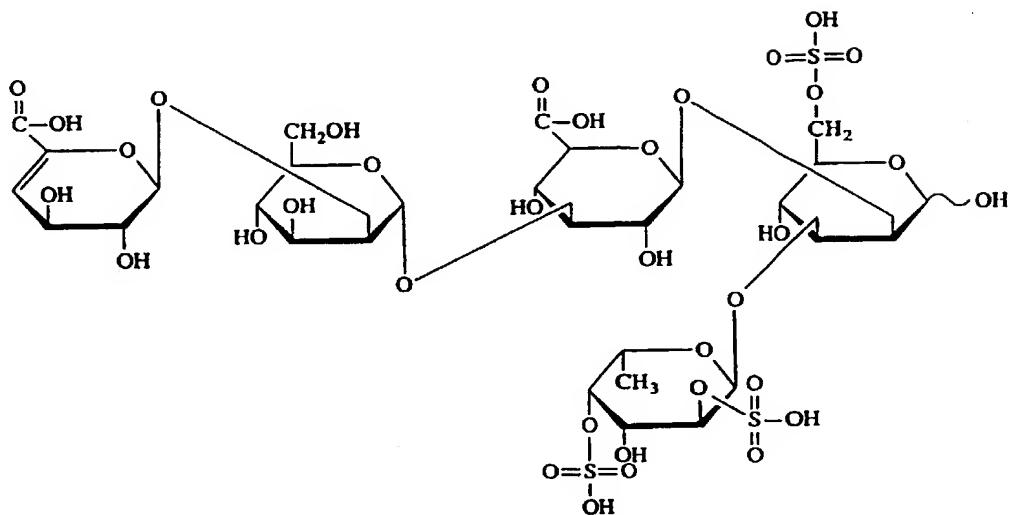
4. 下記式(9)で表される糖化合物又はその塩。

(9)



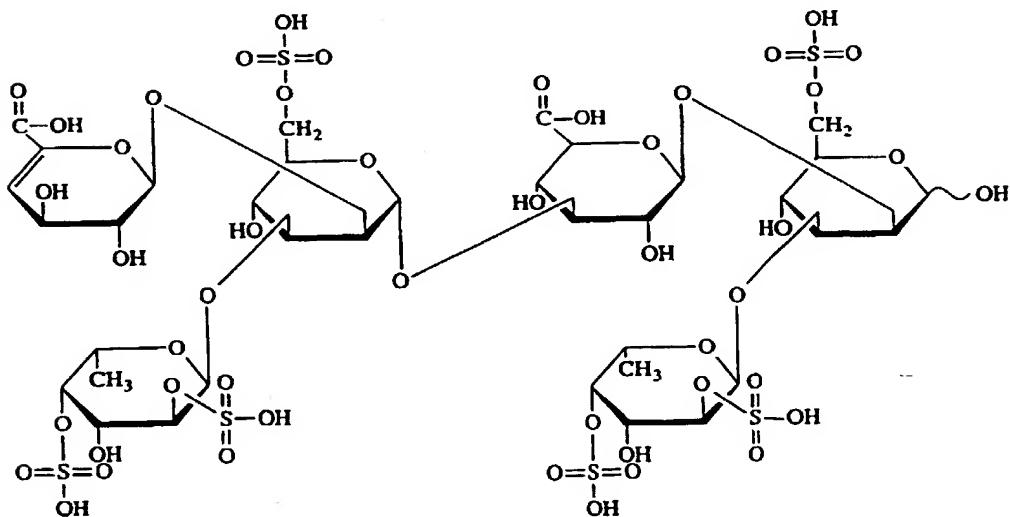
5. 下記式(10)で表される糖化合物又はその塩。

(10)



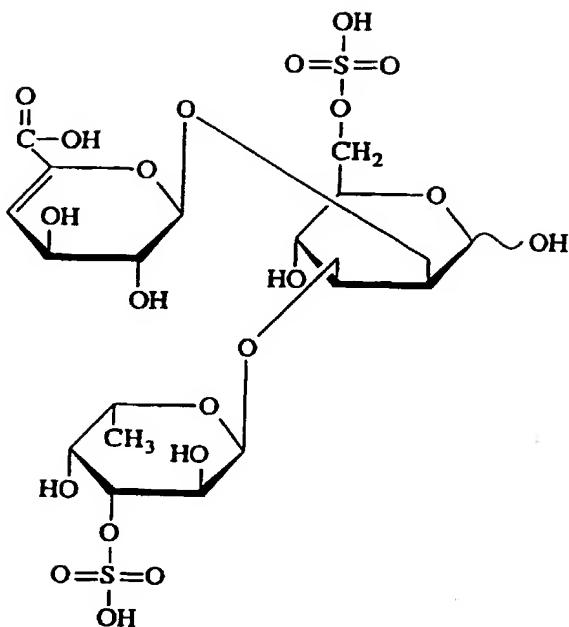
6. 下記式(11)で表される糖化合物又はその塩。

(11)



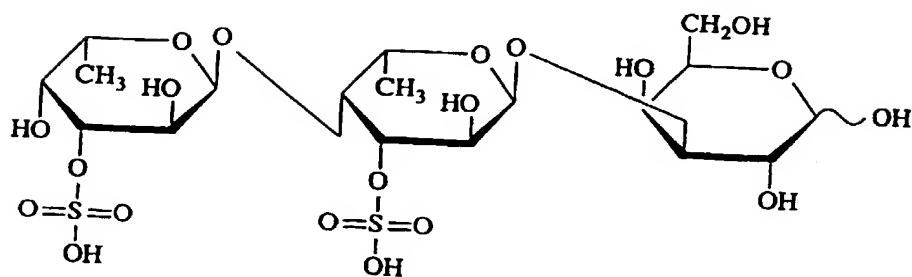
7. 下記式(12)で表される糖化合物又はその塩。

(12)



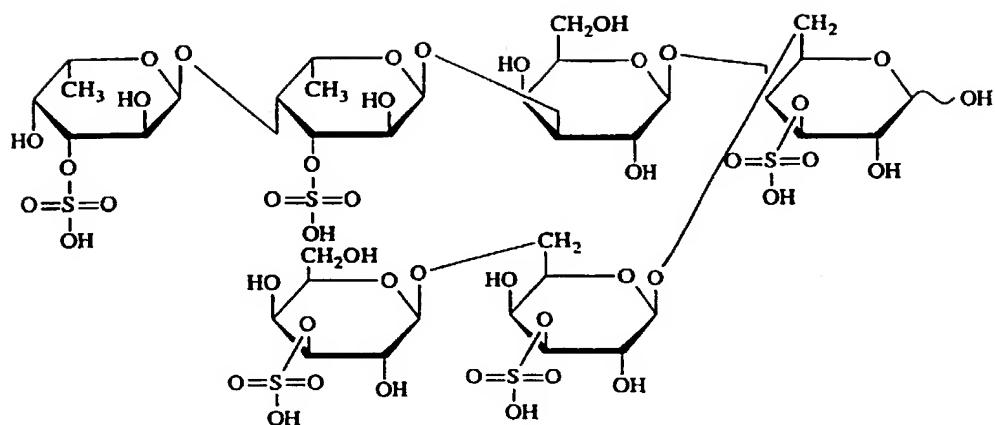
8. 下記式（13）で表される糖化合物又はその塩。

(13)



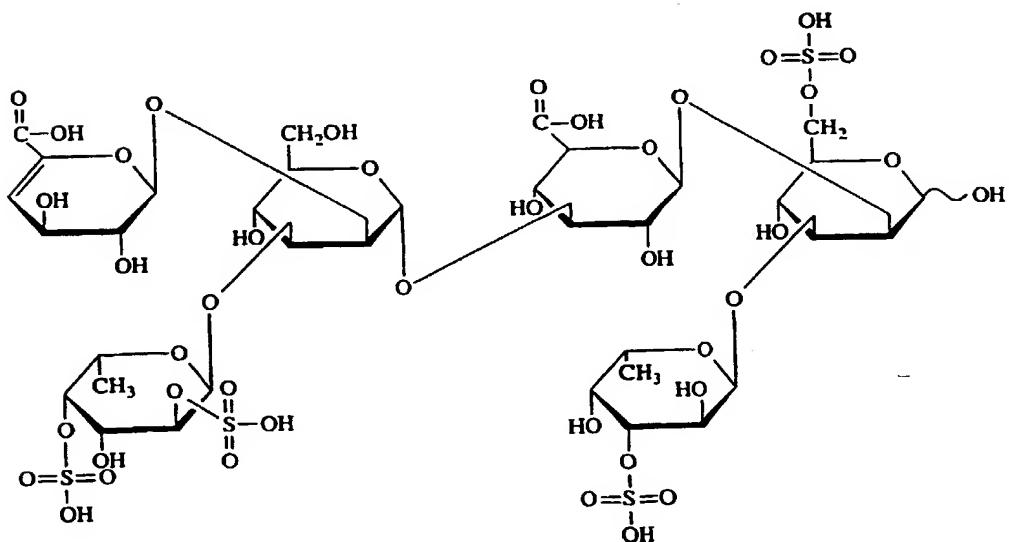
9. 下記式（14）で表される糖化合物又はその塩。

(14)



10. 下記式 (15) で表される糖化合物又はその塩。

(15)



11. 下記の理化学的性質を有することを特徴とするエンド型フコイダン分解酵素。

(I) 作用：フコイダンに作用して、少なくとも前記式(7)及び式(8)で表される化合物を遊離させる。

(II) 至適pH：本酵素の至適pHは6から10である。

(III) 至適温度：本酵素の至適温度は30から40°Cである。

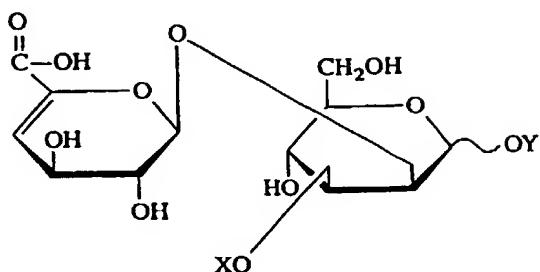
12. 電子伝達鎖にメナキノンを有し、GC含量が約60%である、フコイダノバクター属に属する細菌。

要 約 書

新規なエンド型のフコイダン分解酵素、及び糖化合物の製造に有用な新規微生物を提供する。

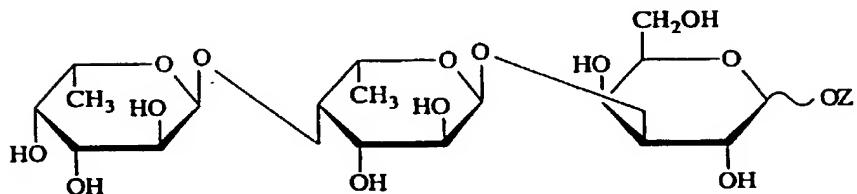
下記一般式（1）：

(1)



[式中、YはH又は下記式（2）：

(2)



で表される基を示す] で表される化合物中の少なくとも一つのアルコール性水酸基が硫酸エステル化している糖化合物又はその塩。

図1

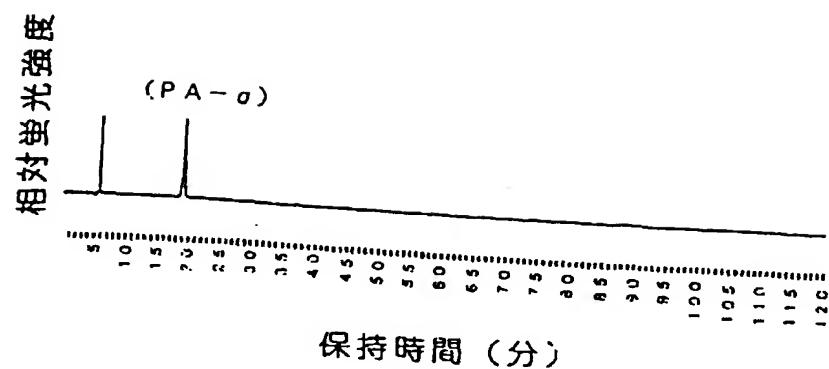


図2

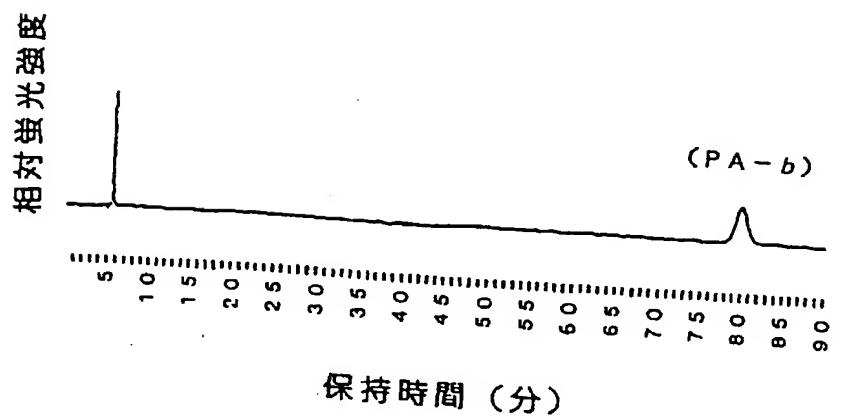


図3

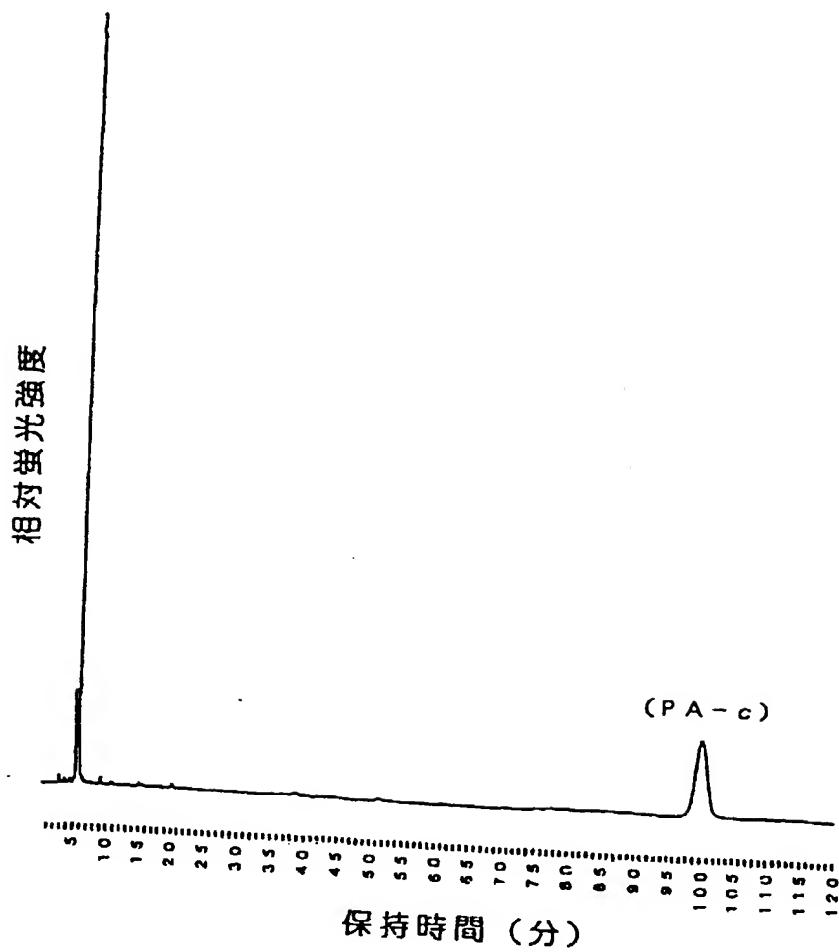


図4

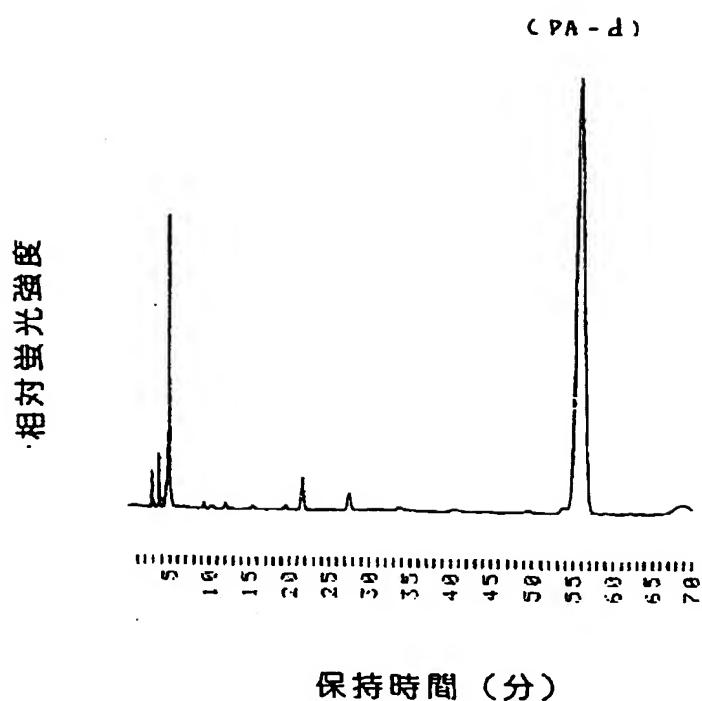


図5

(PA-e)

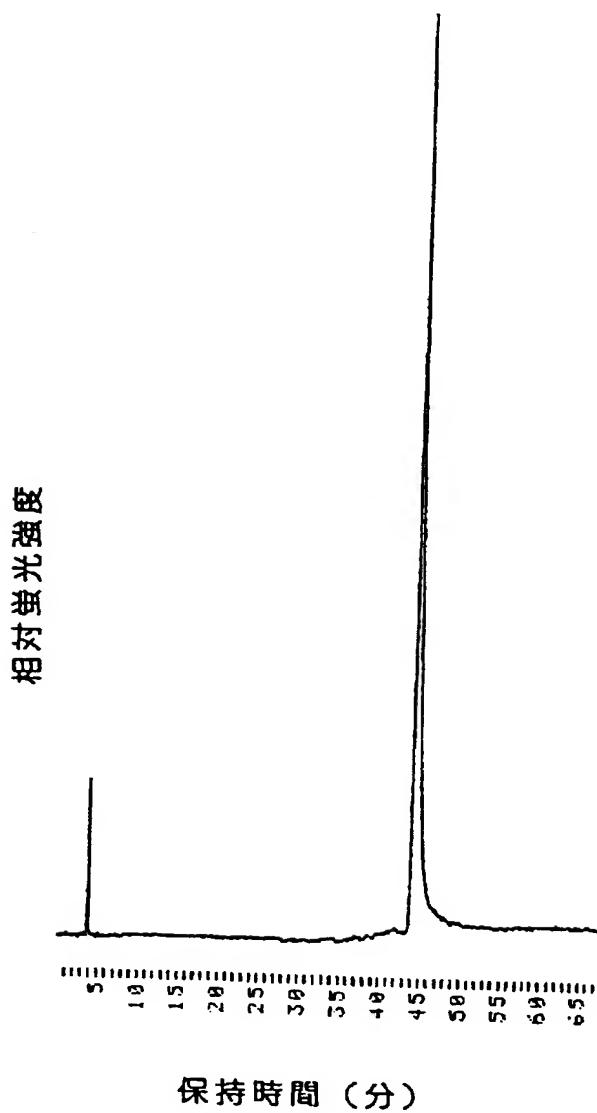


図6

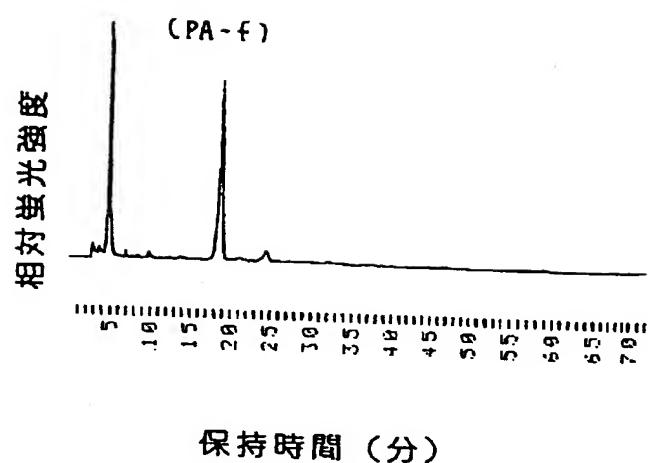


図7

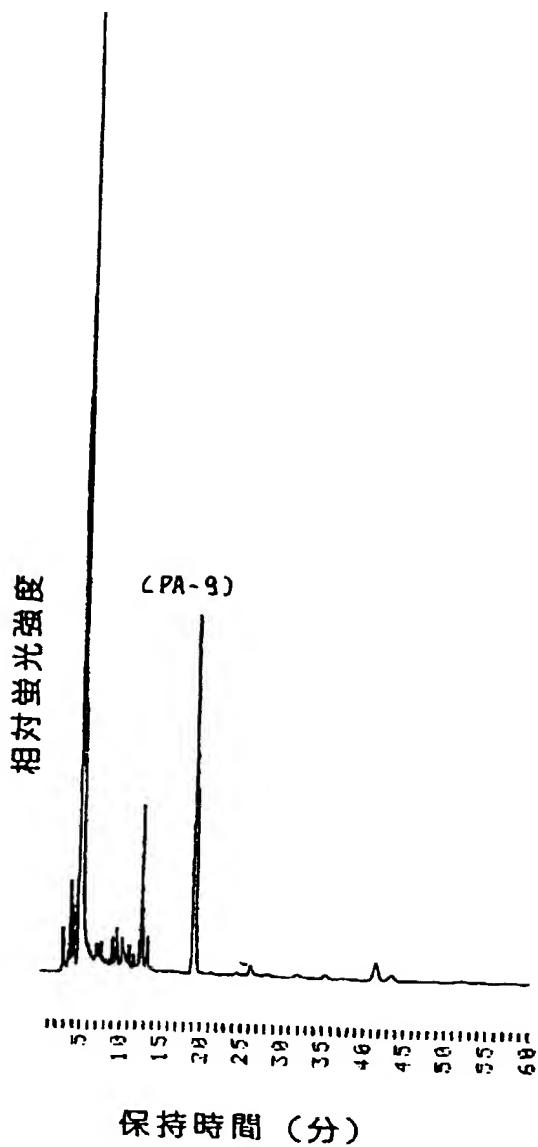


図8

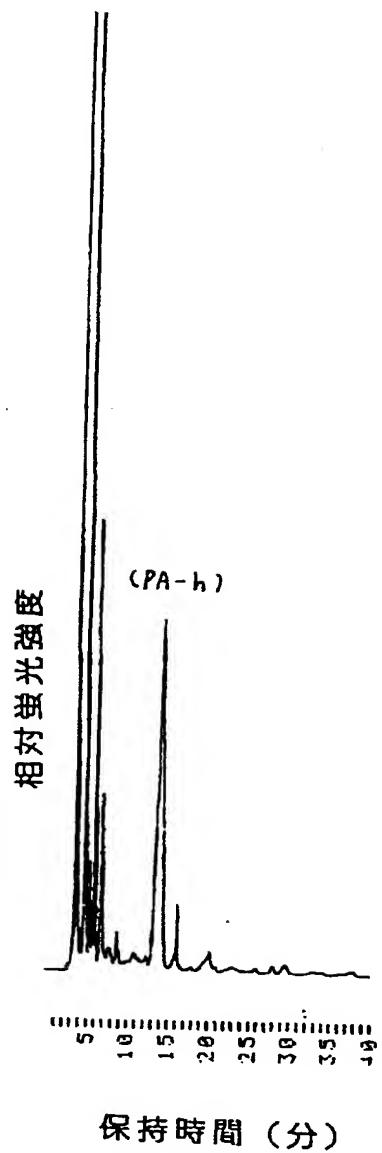


図9

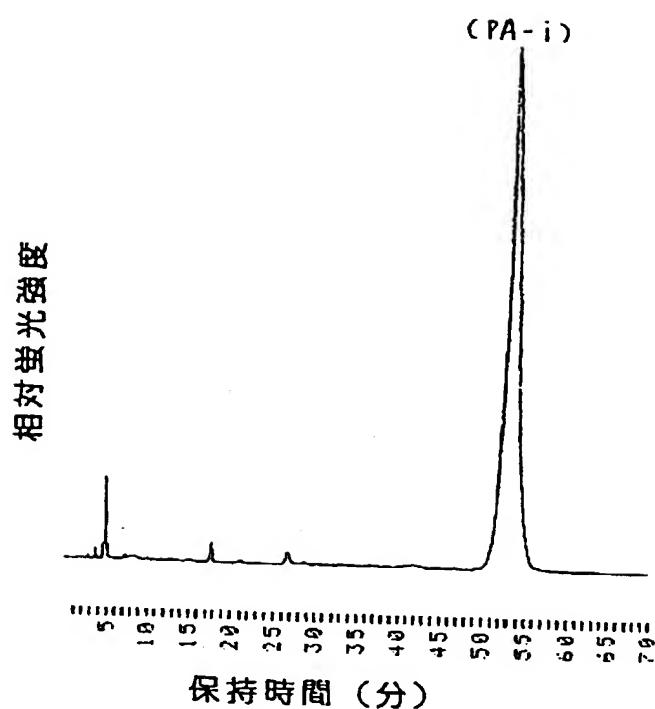


図10

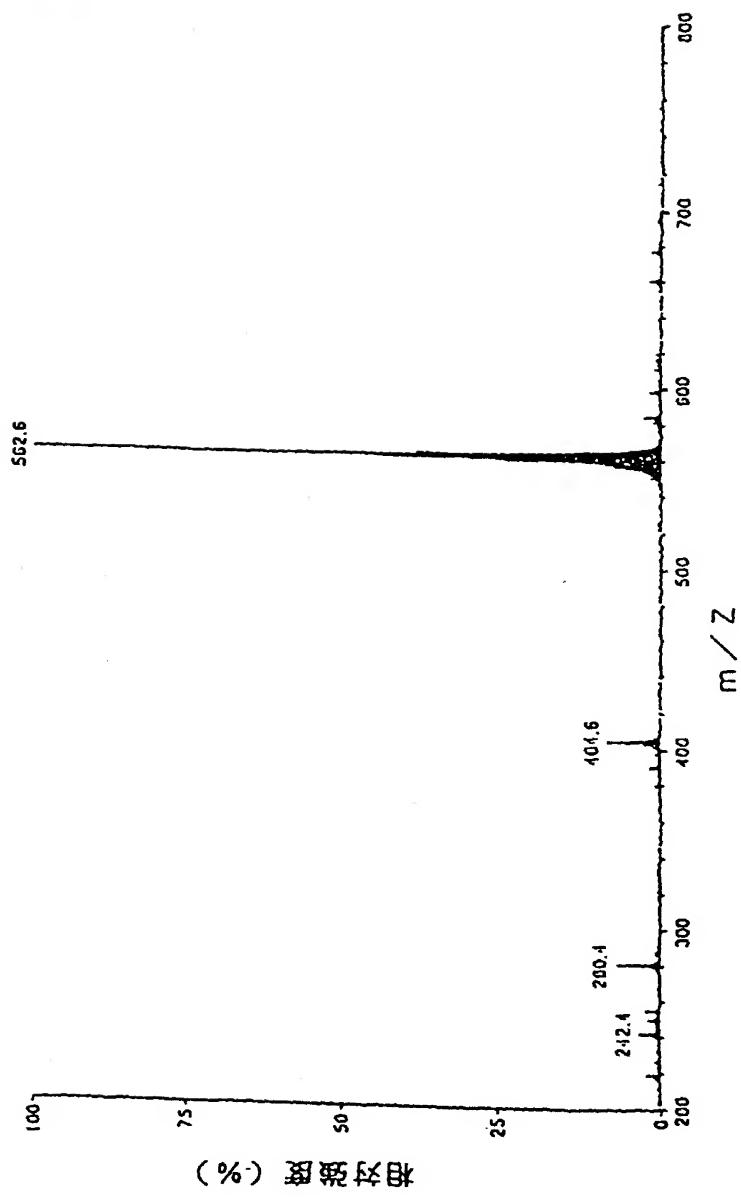


図 1 1

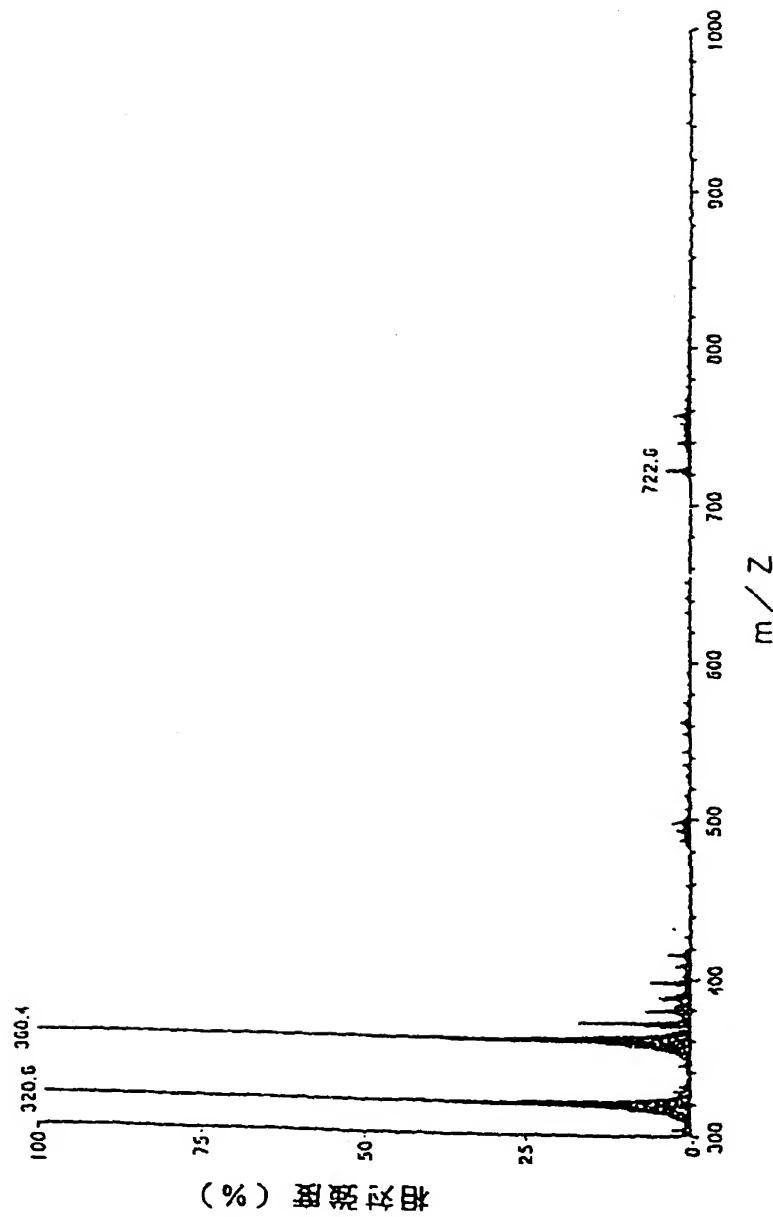


図 12

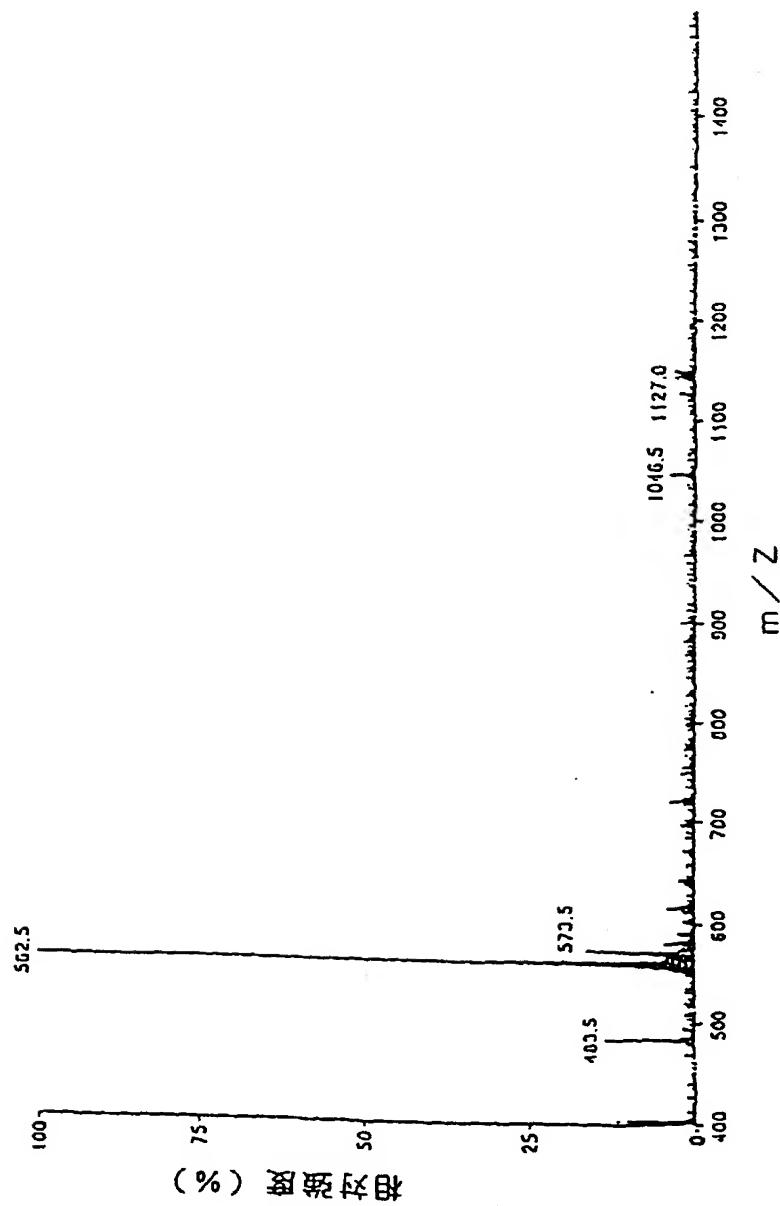
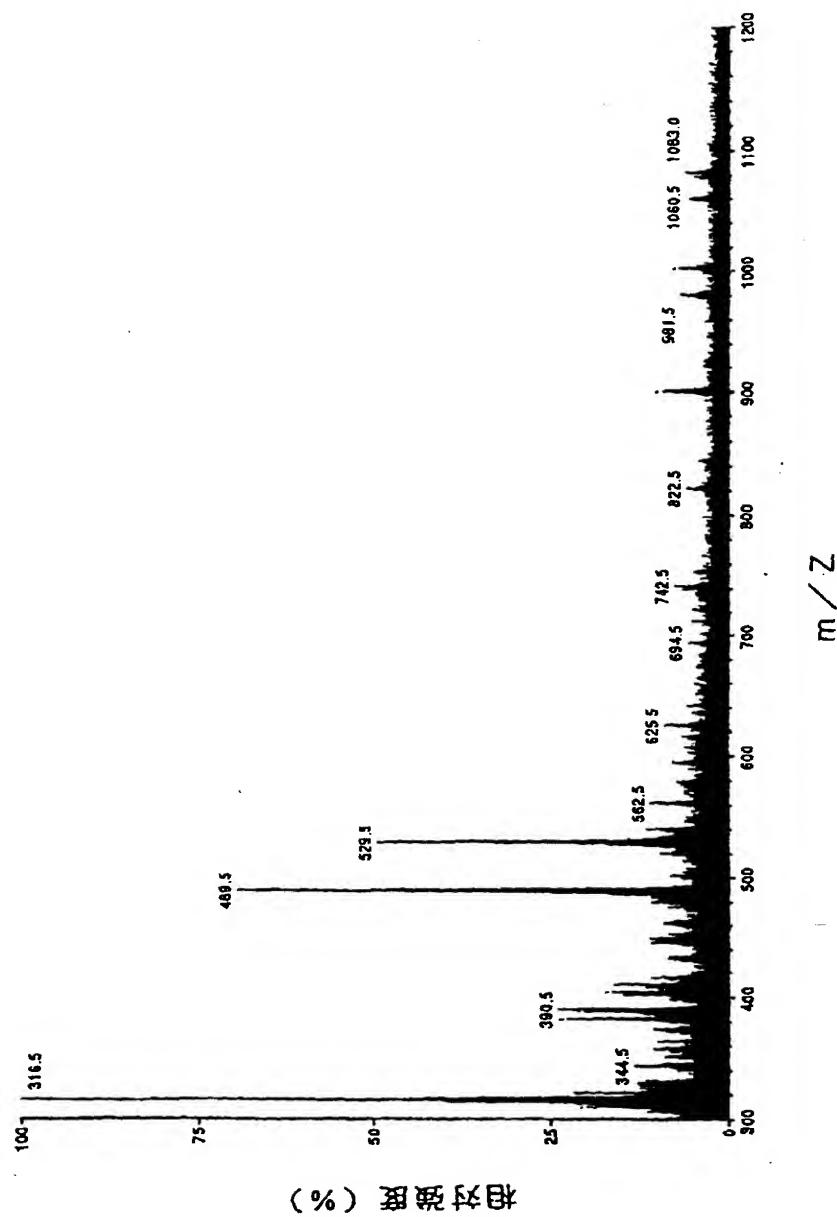


図13



相対強度 (%)

図14

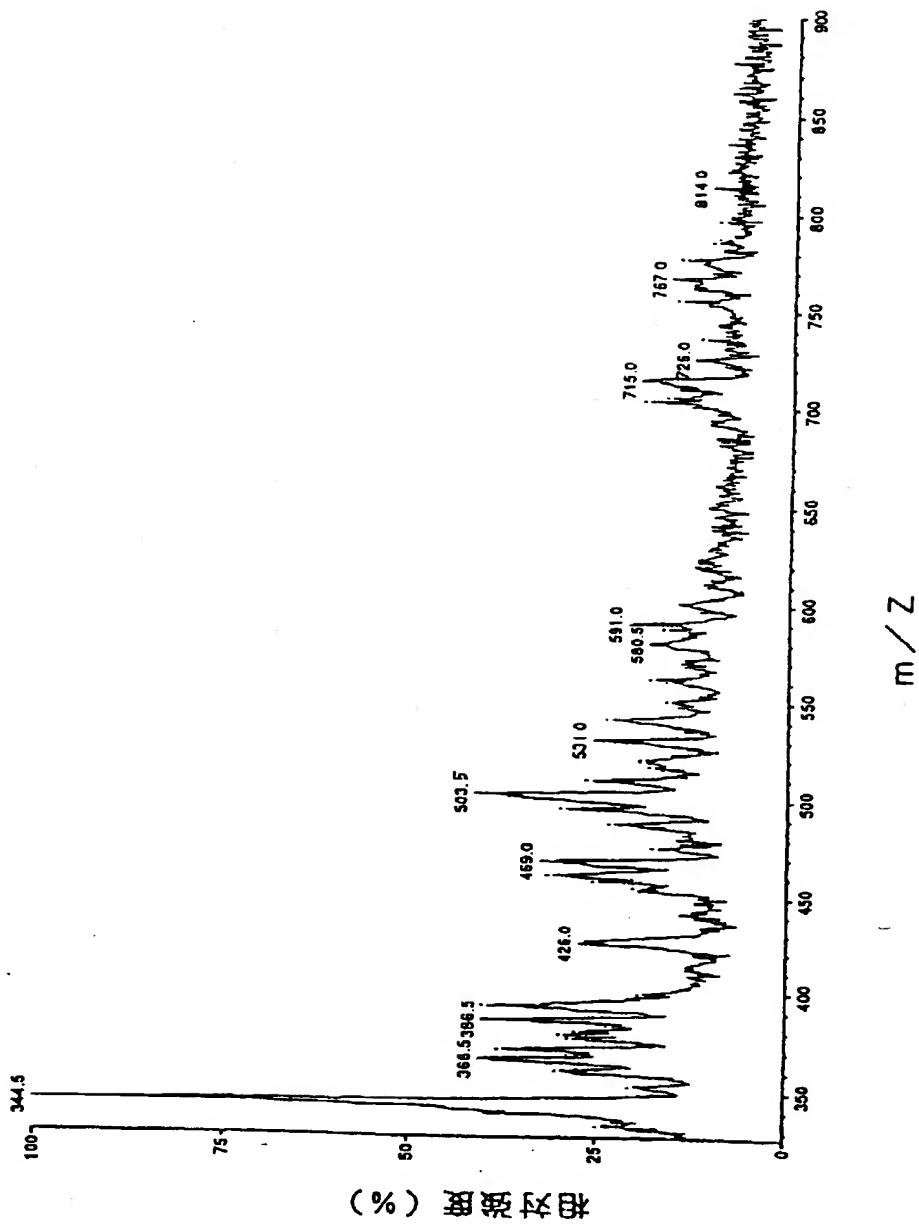


図15

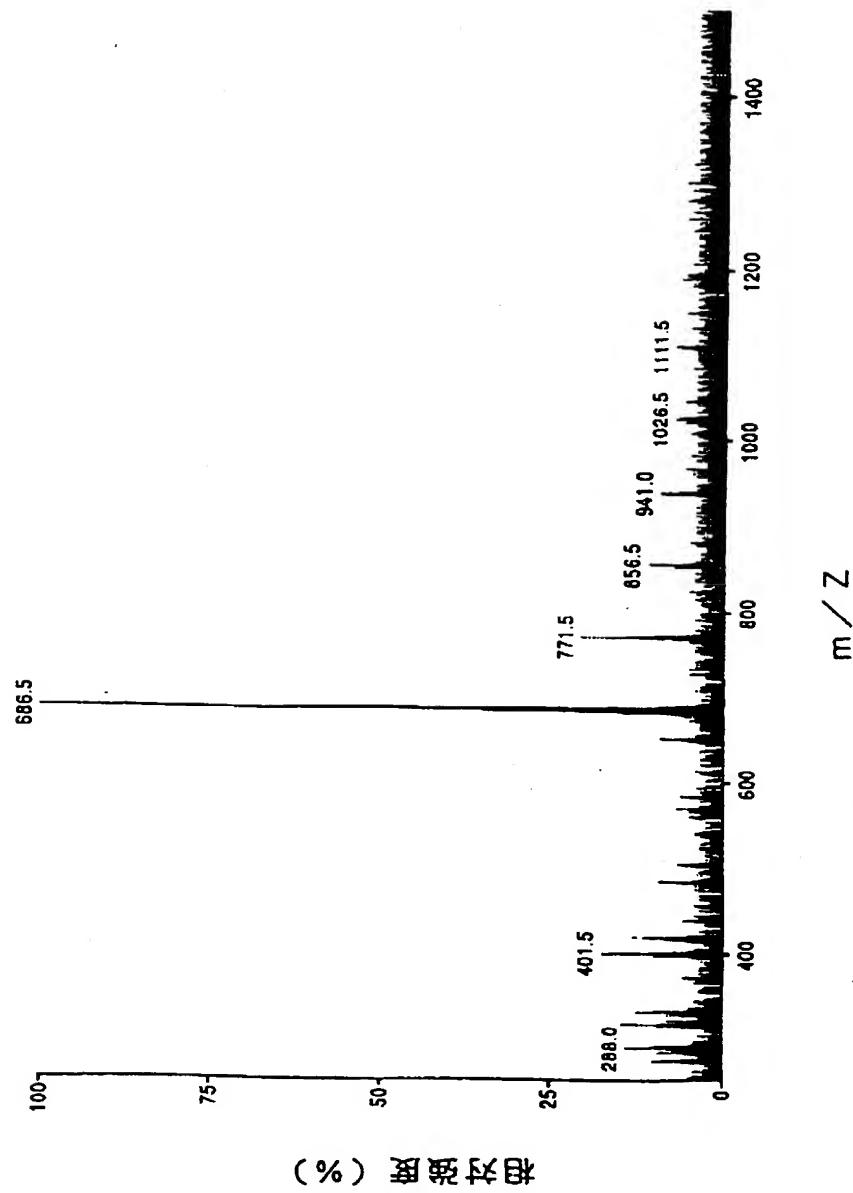


図16

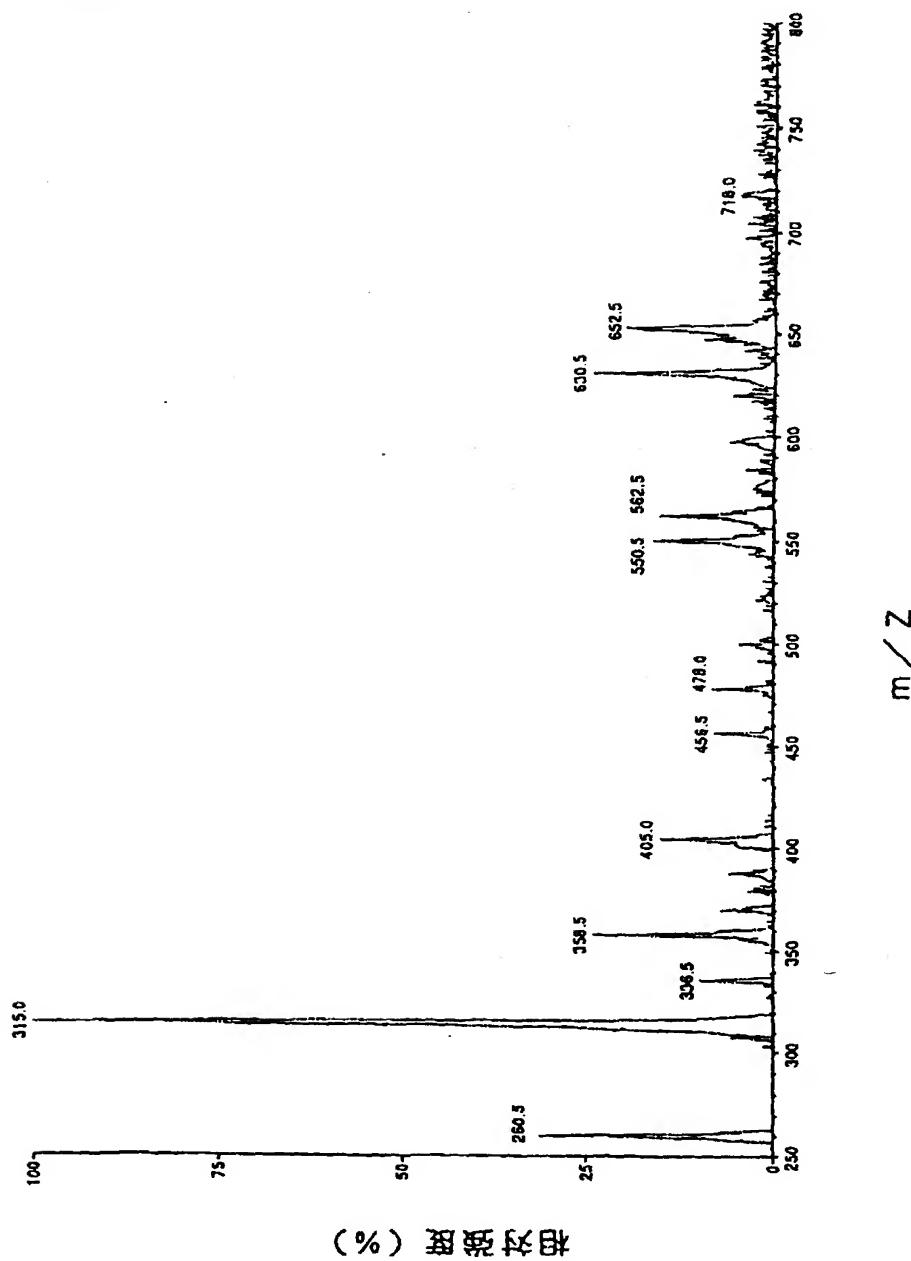


図 17

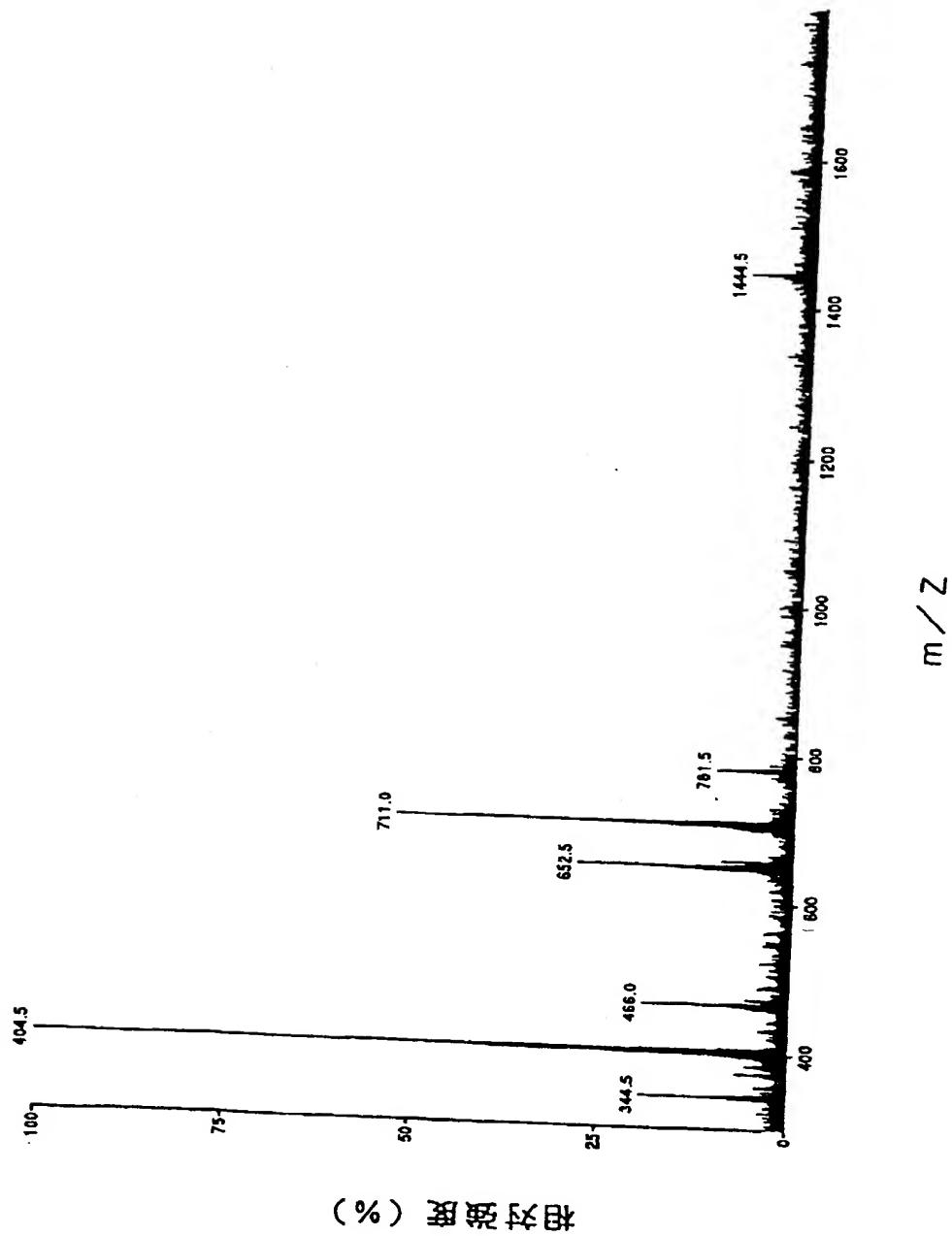


図18

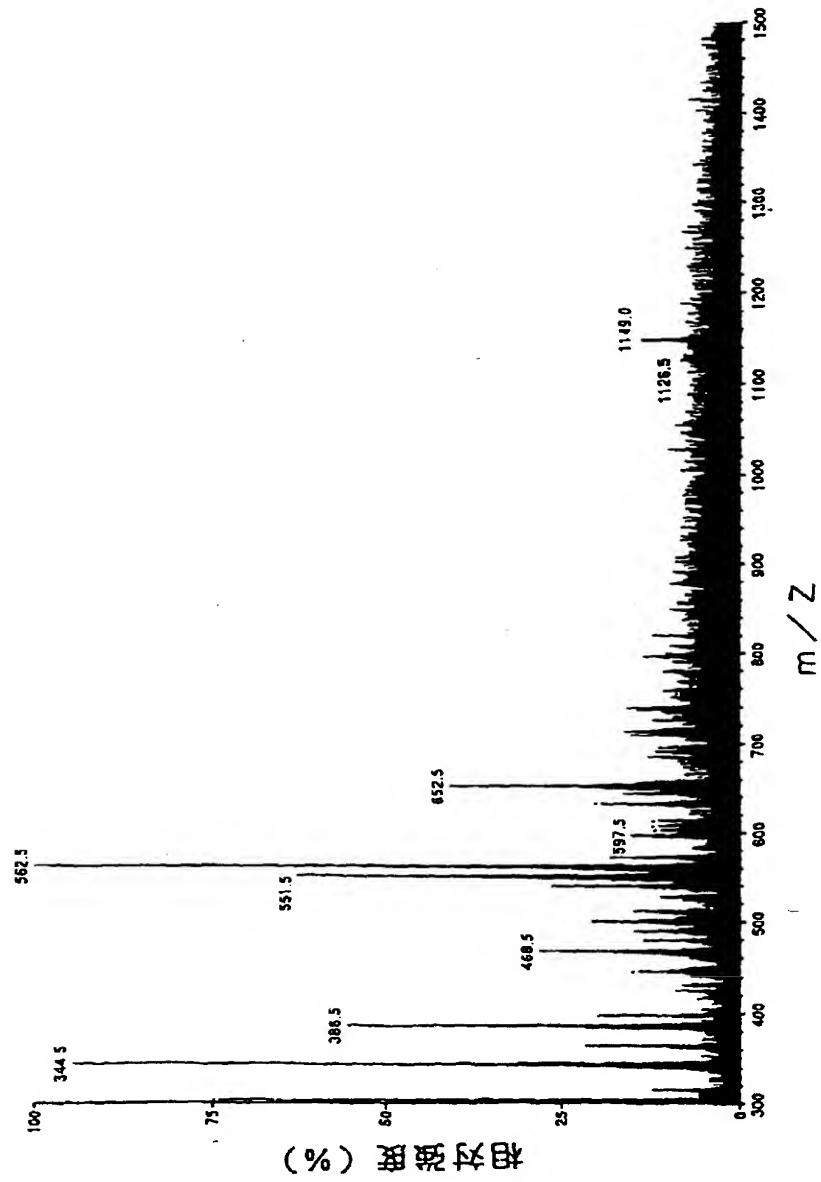


図19

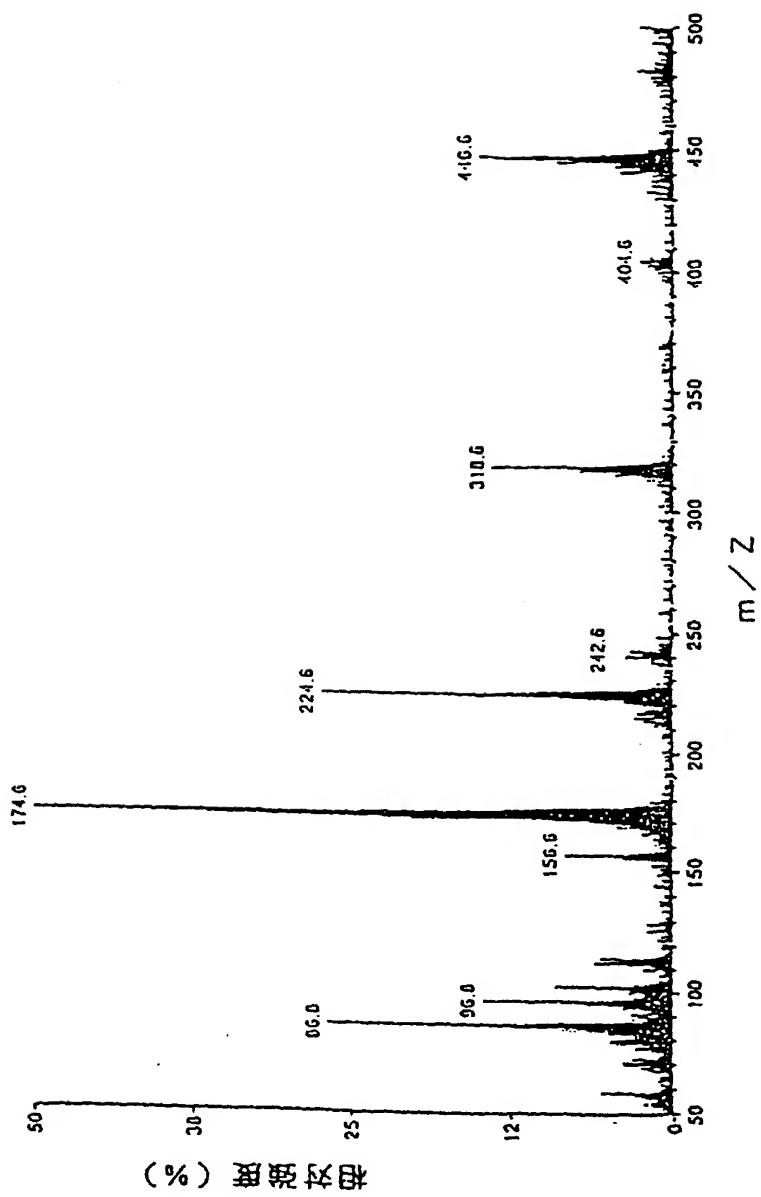


図20

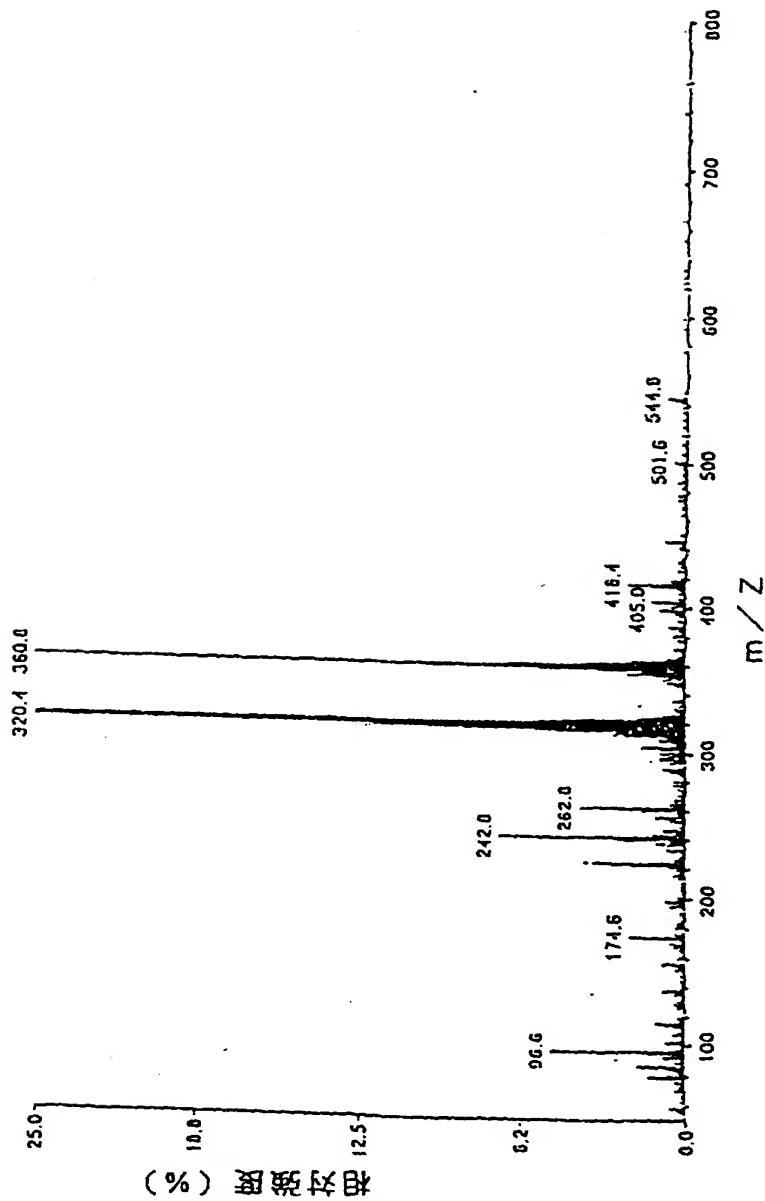


図21

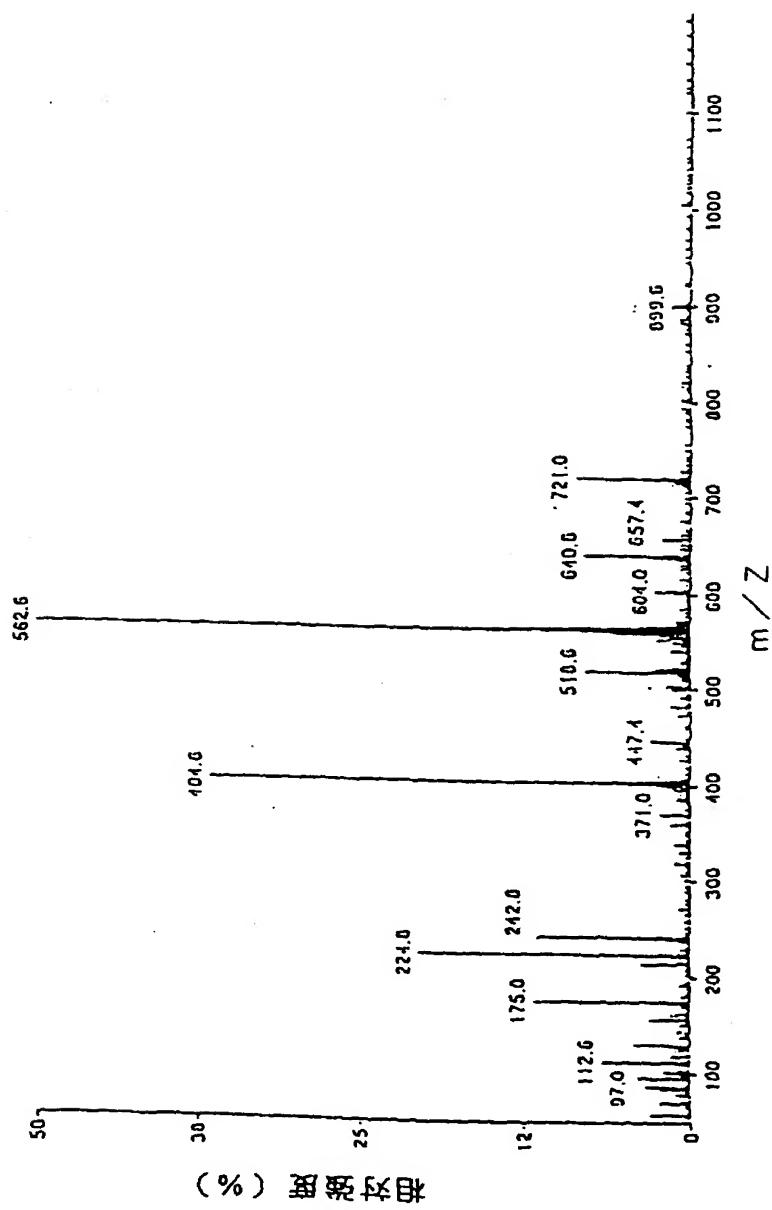


図22

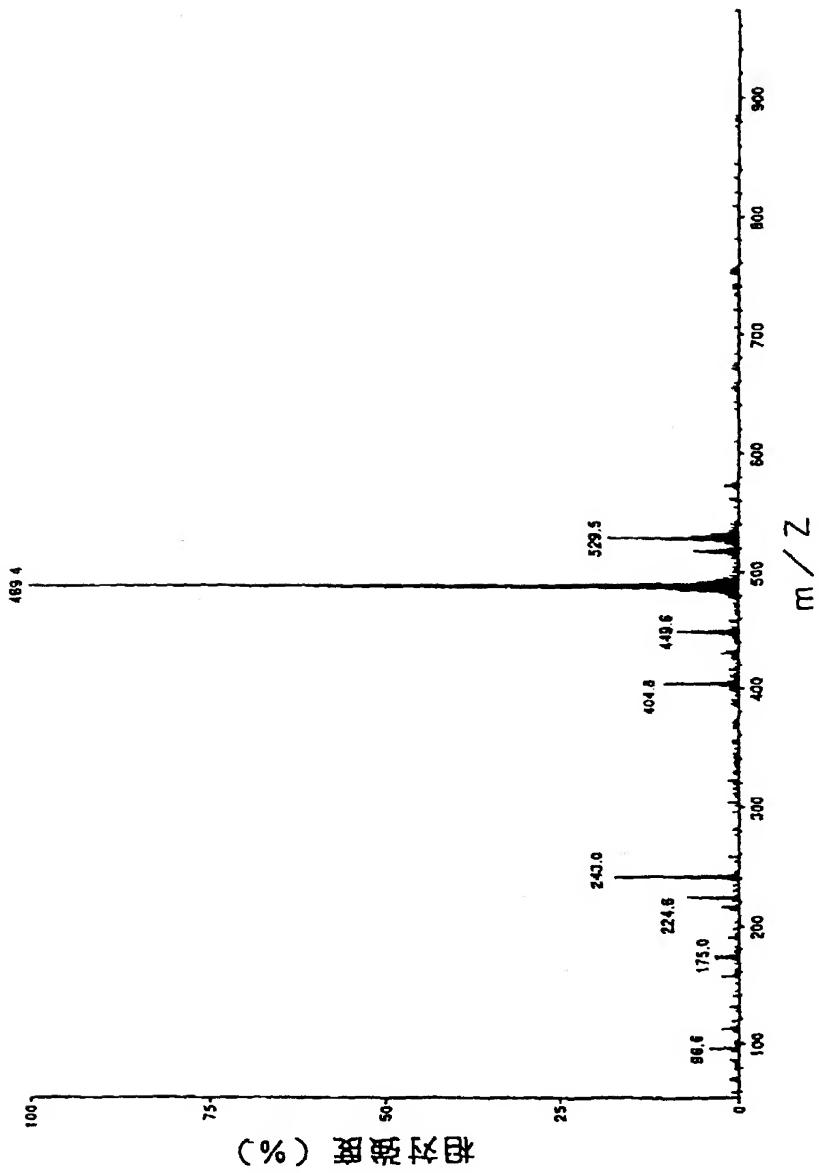


図23

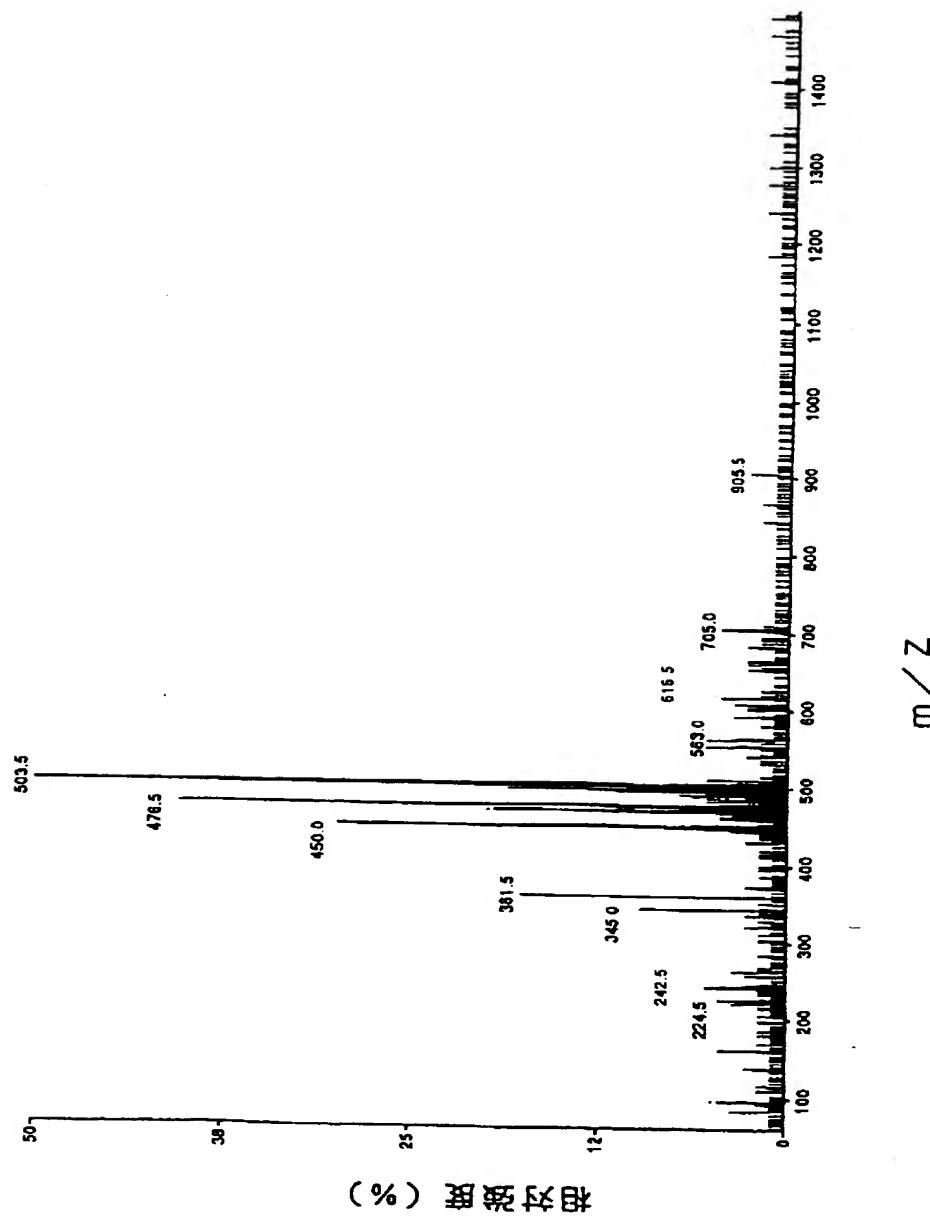


図24

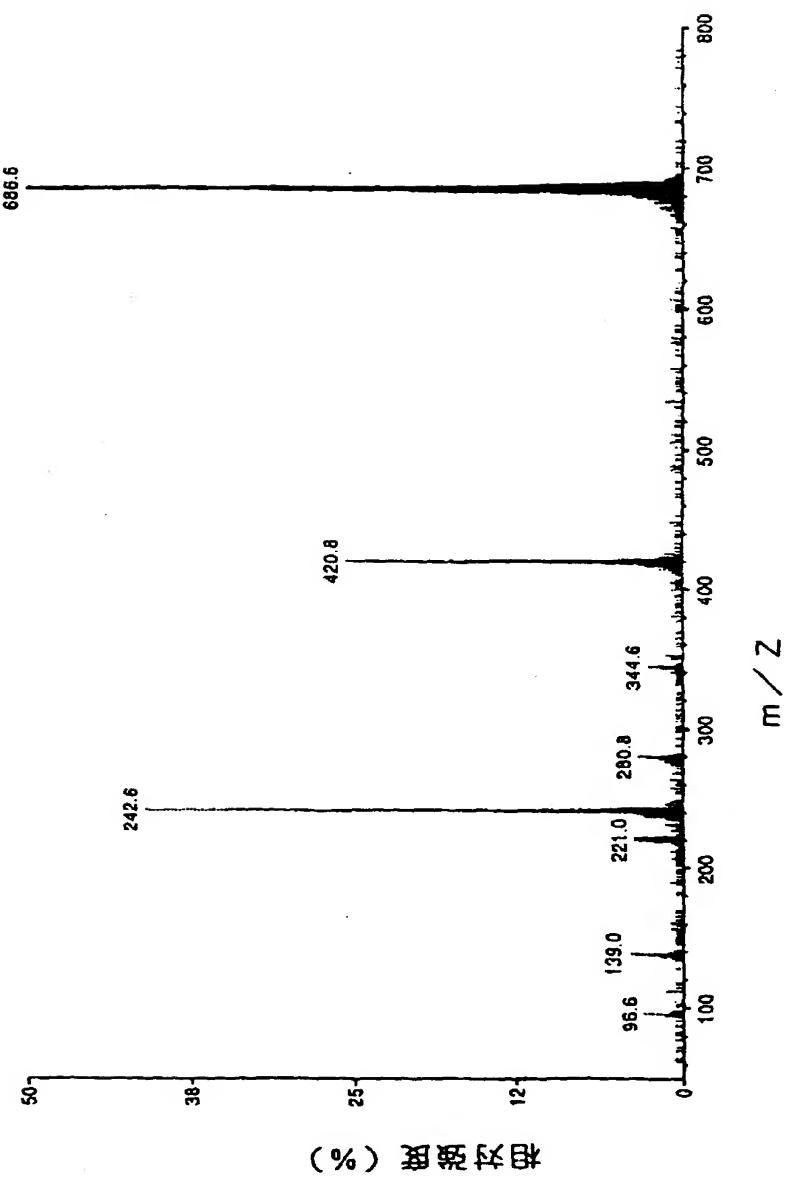


図25

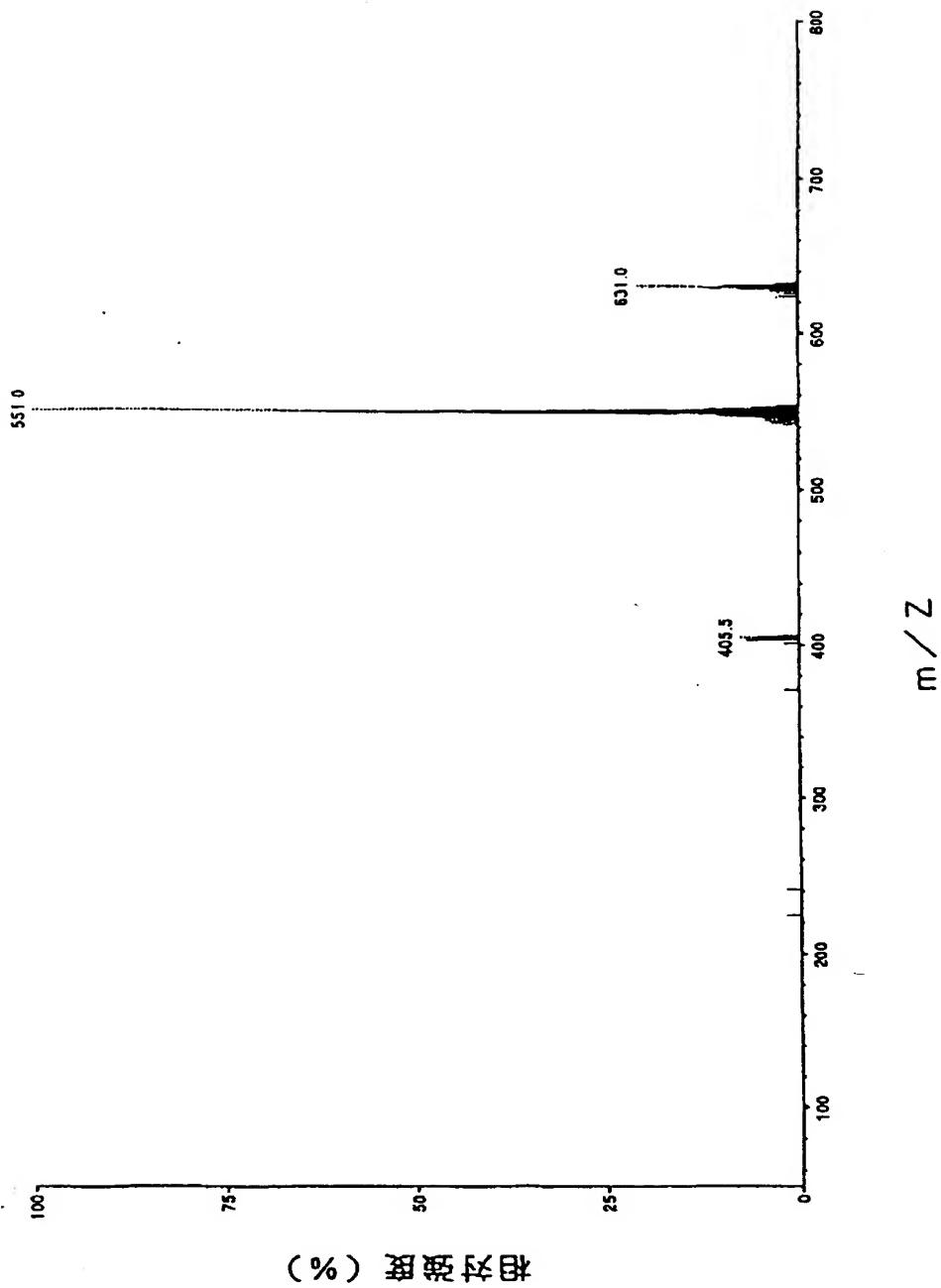


図26

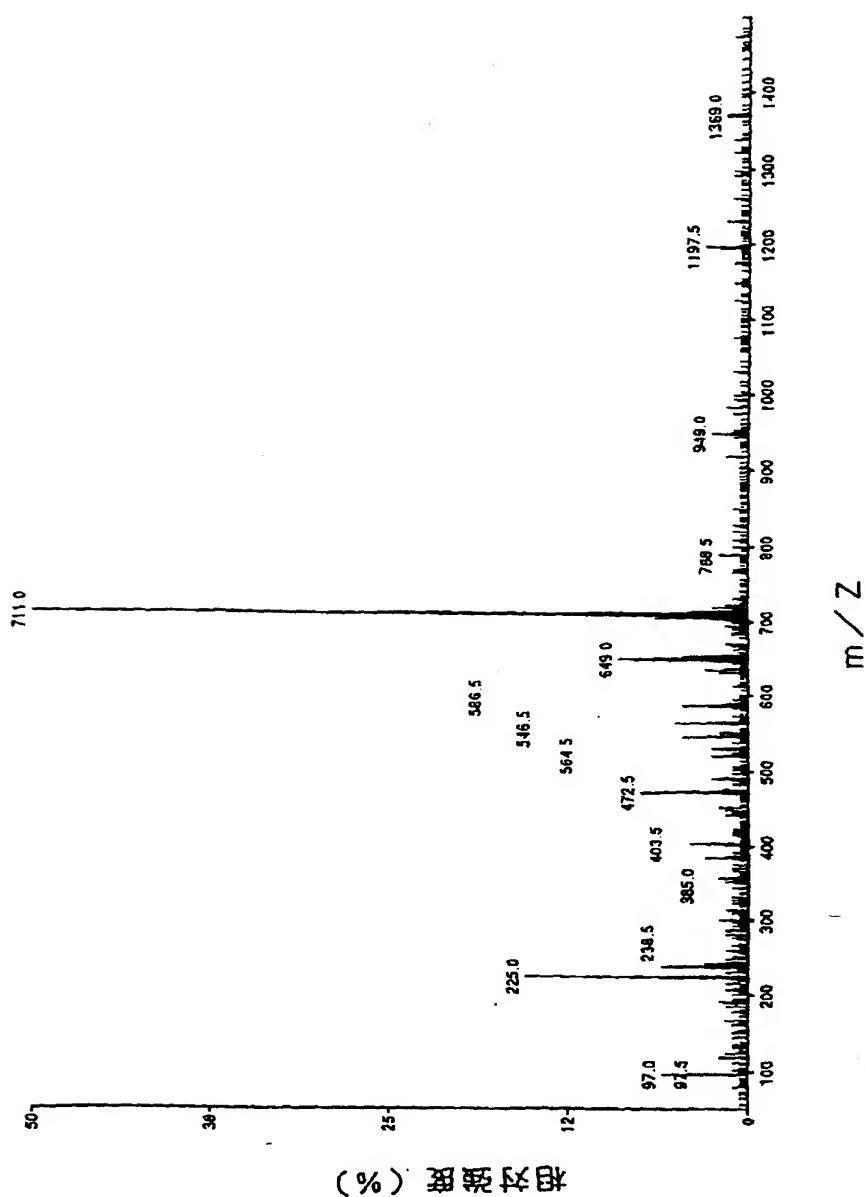


図27

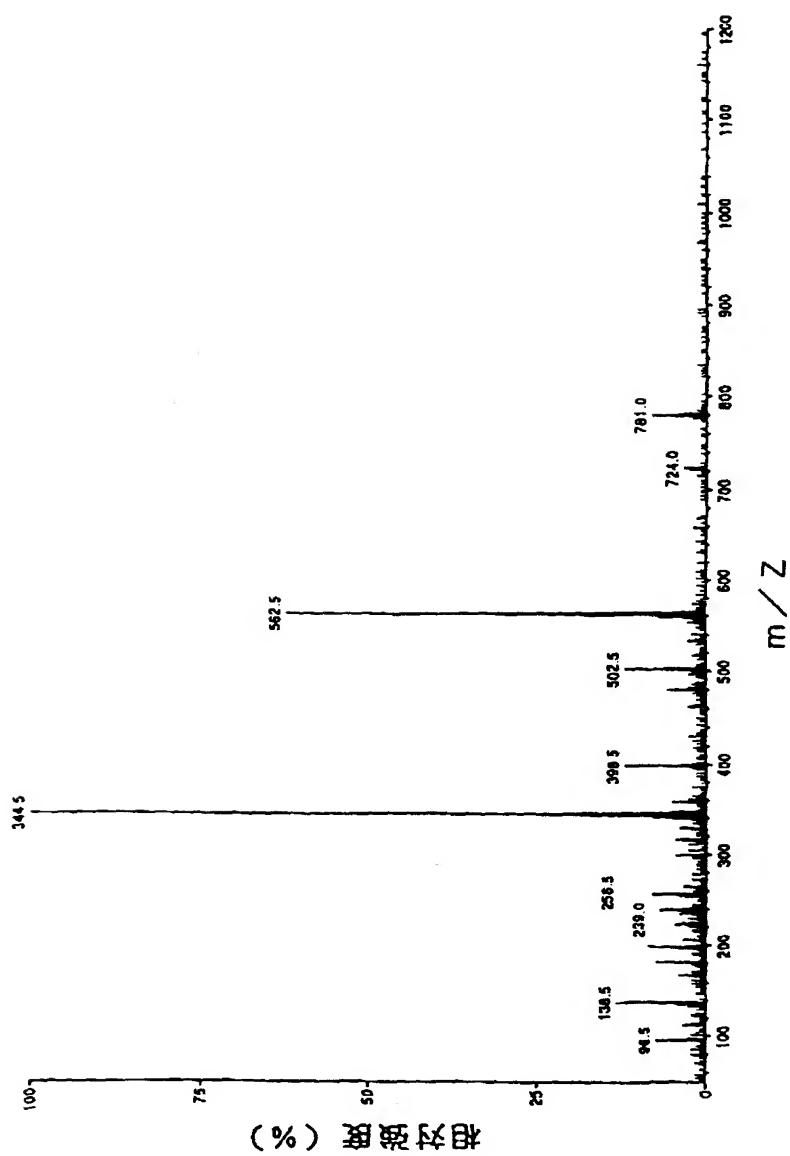


図28

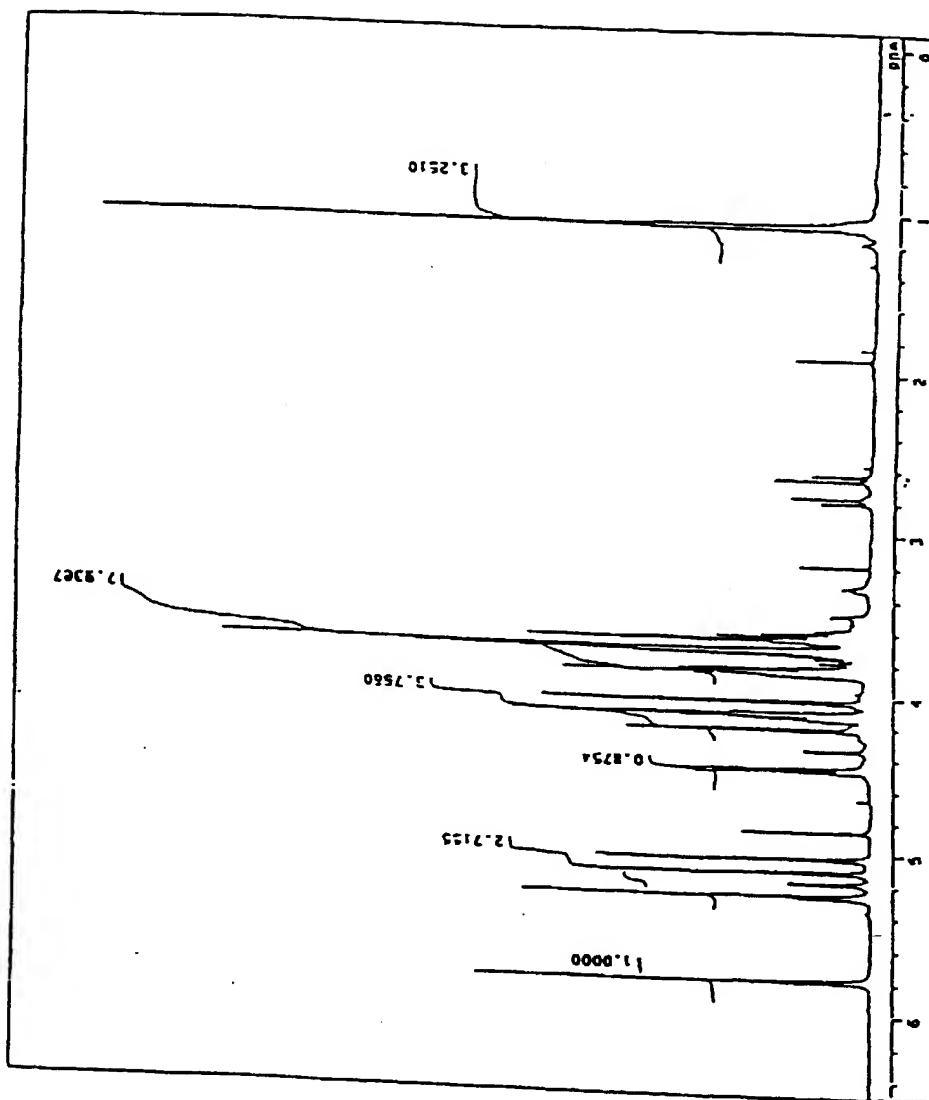


图29

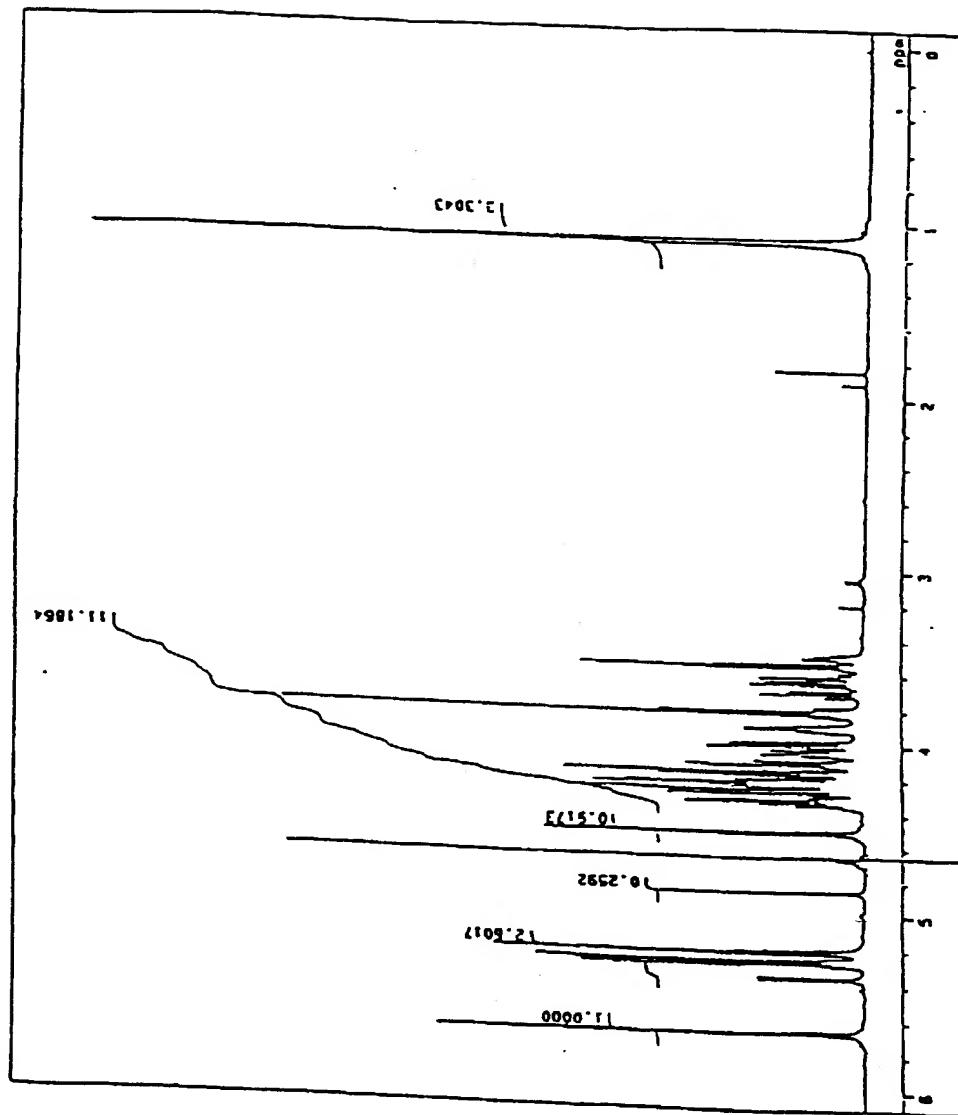


图 30

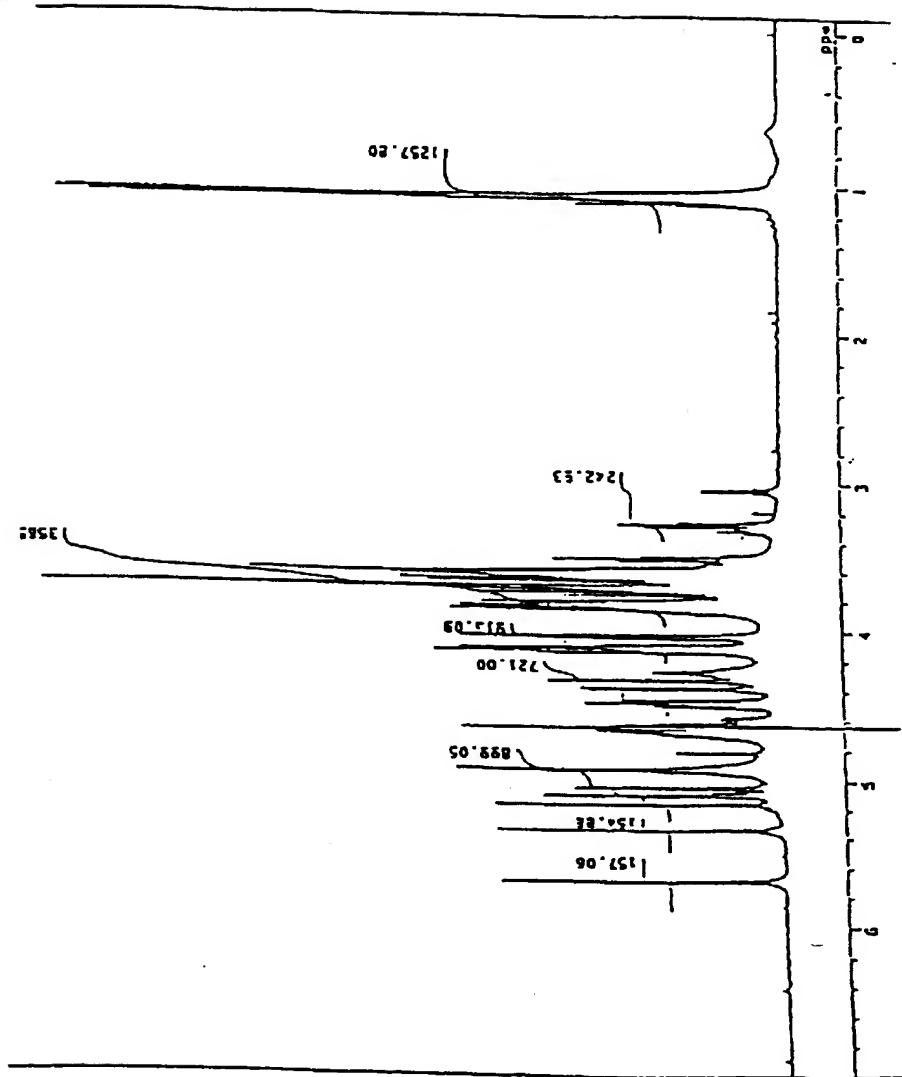


図31

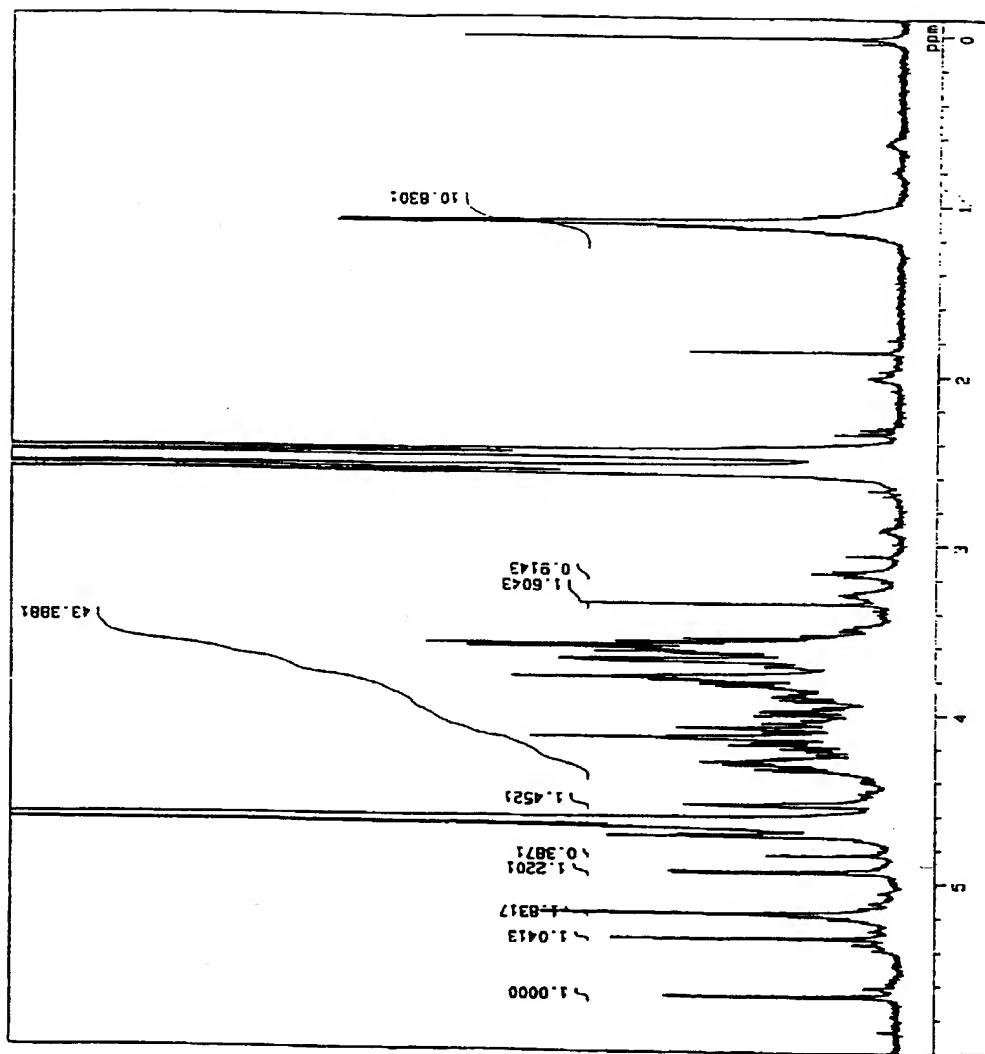


图32

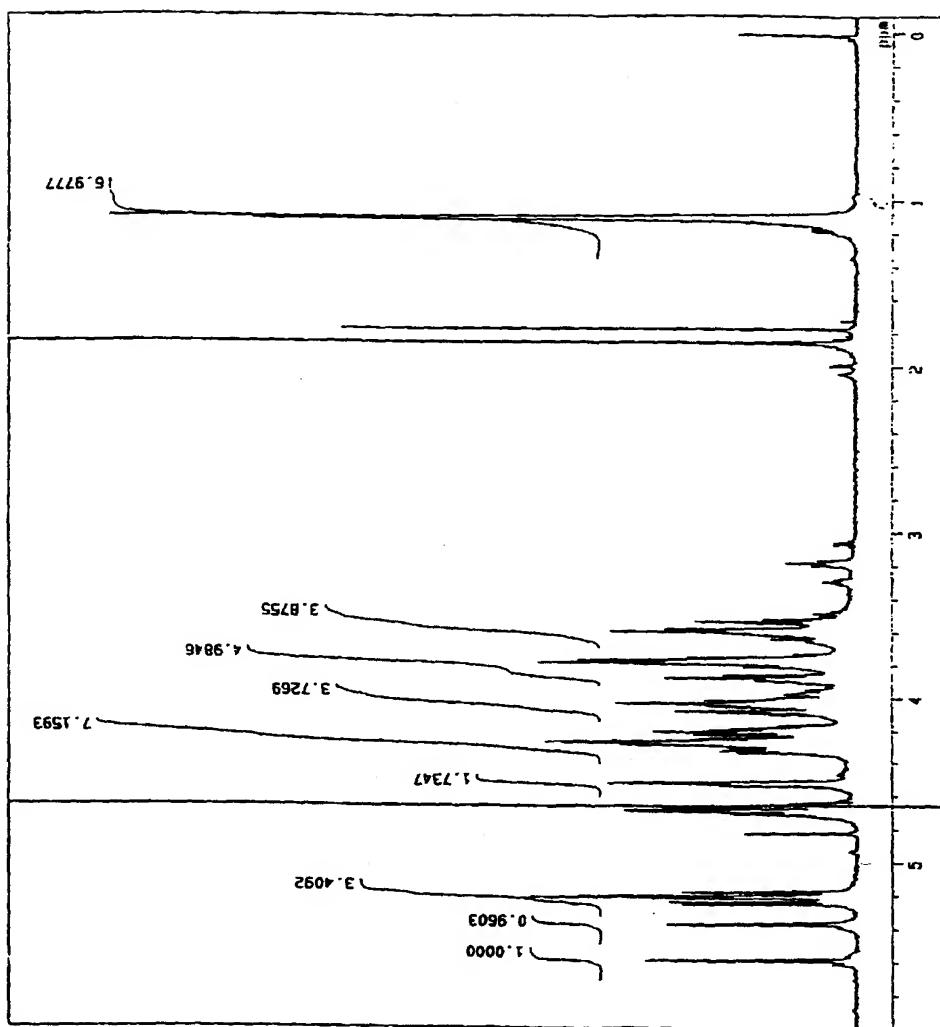


図33

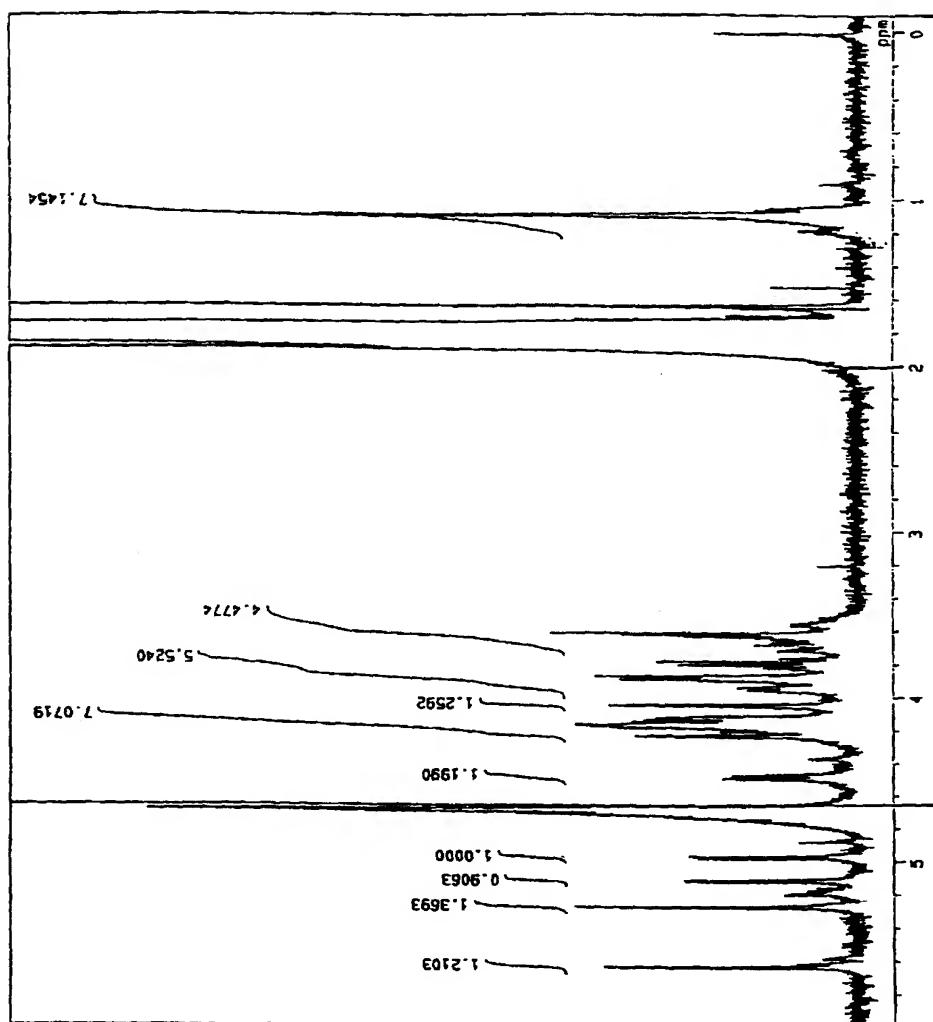


図34

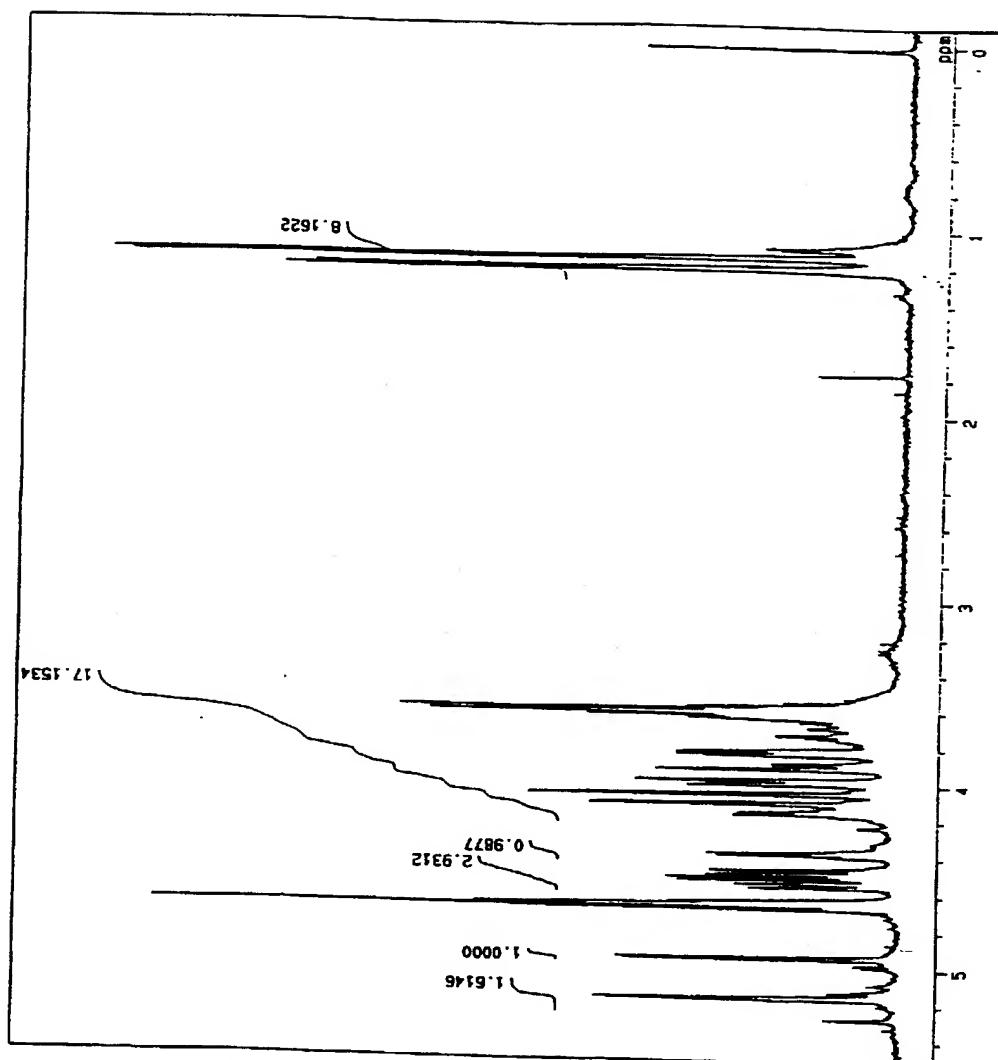


図35

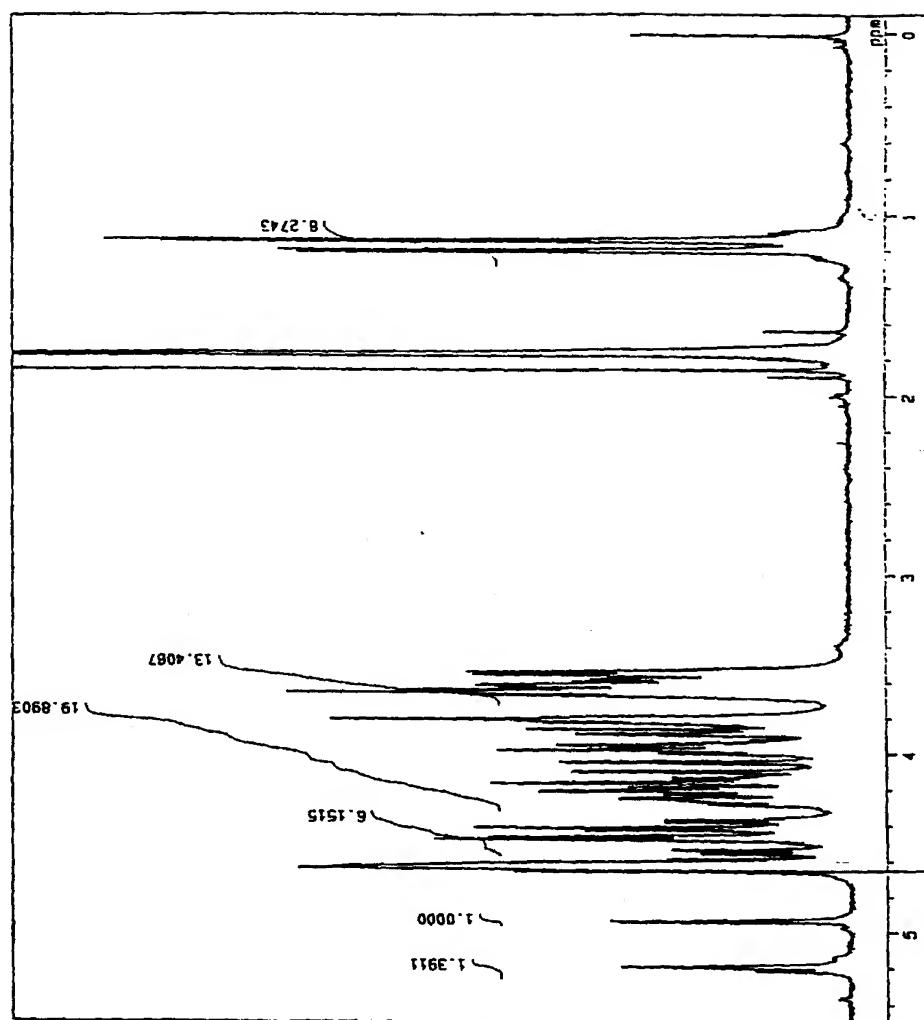


図36

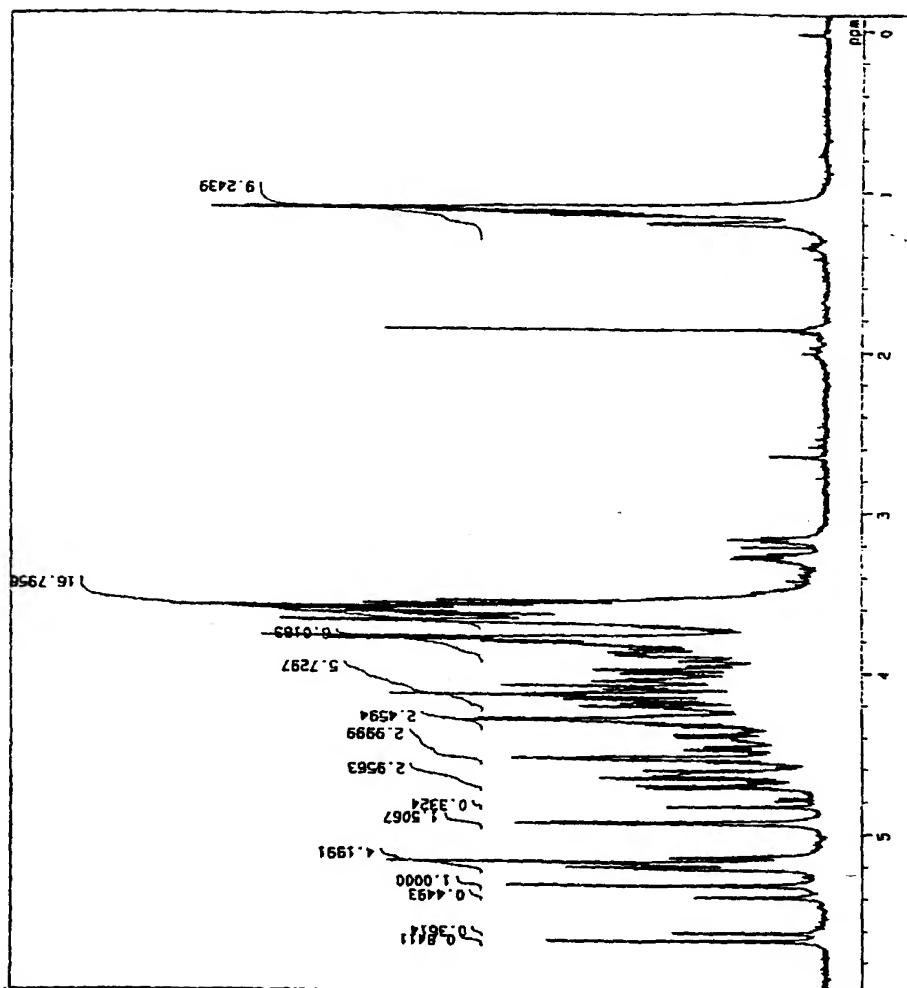


図37

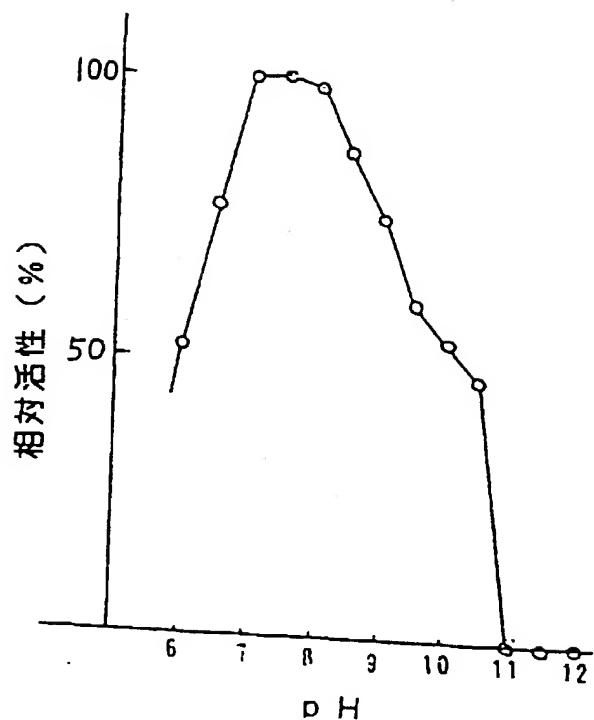


図38

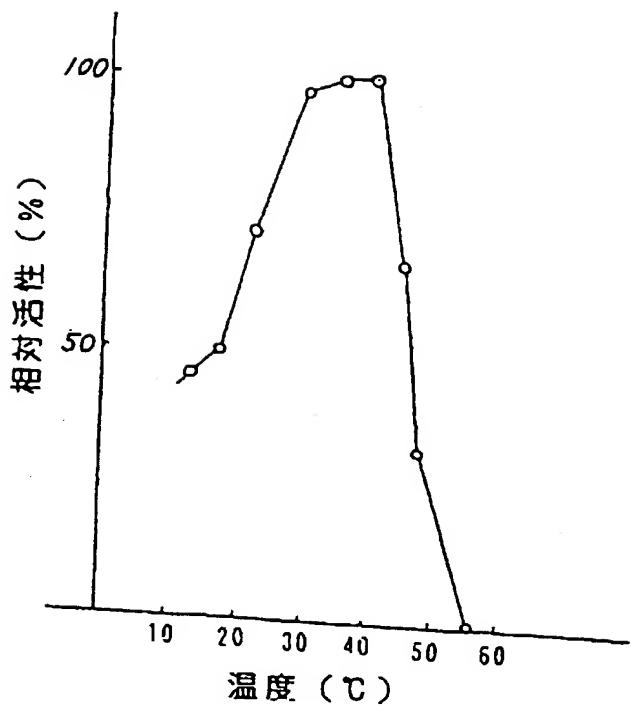


図39

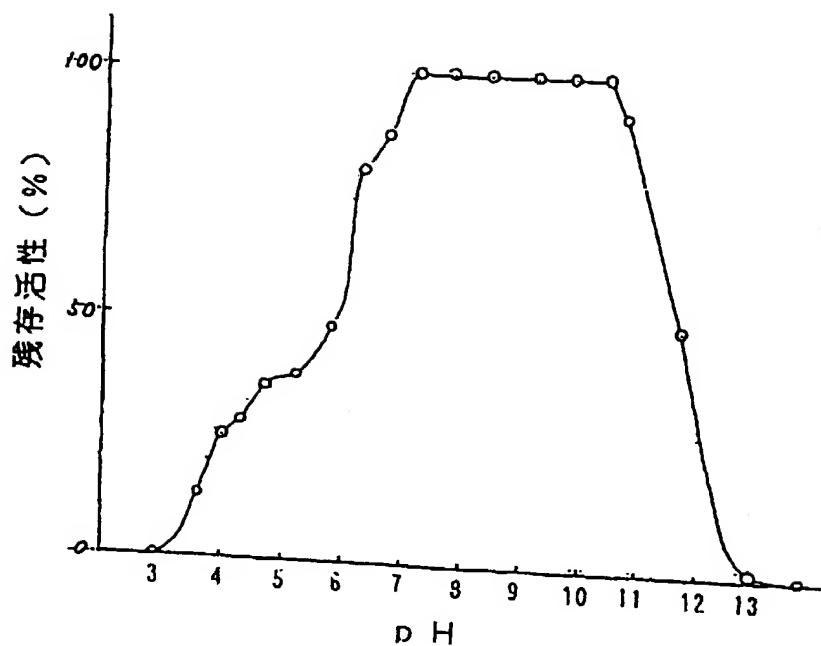


図40

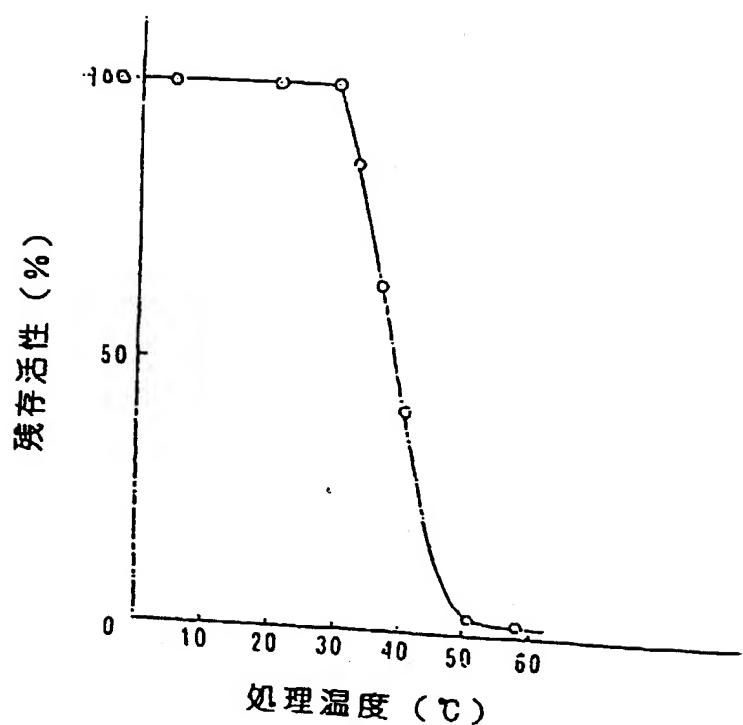


図41

重合度分布 (M)

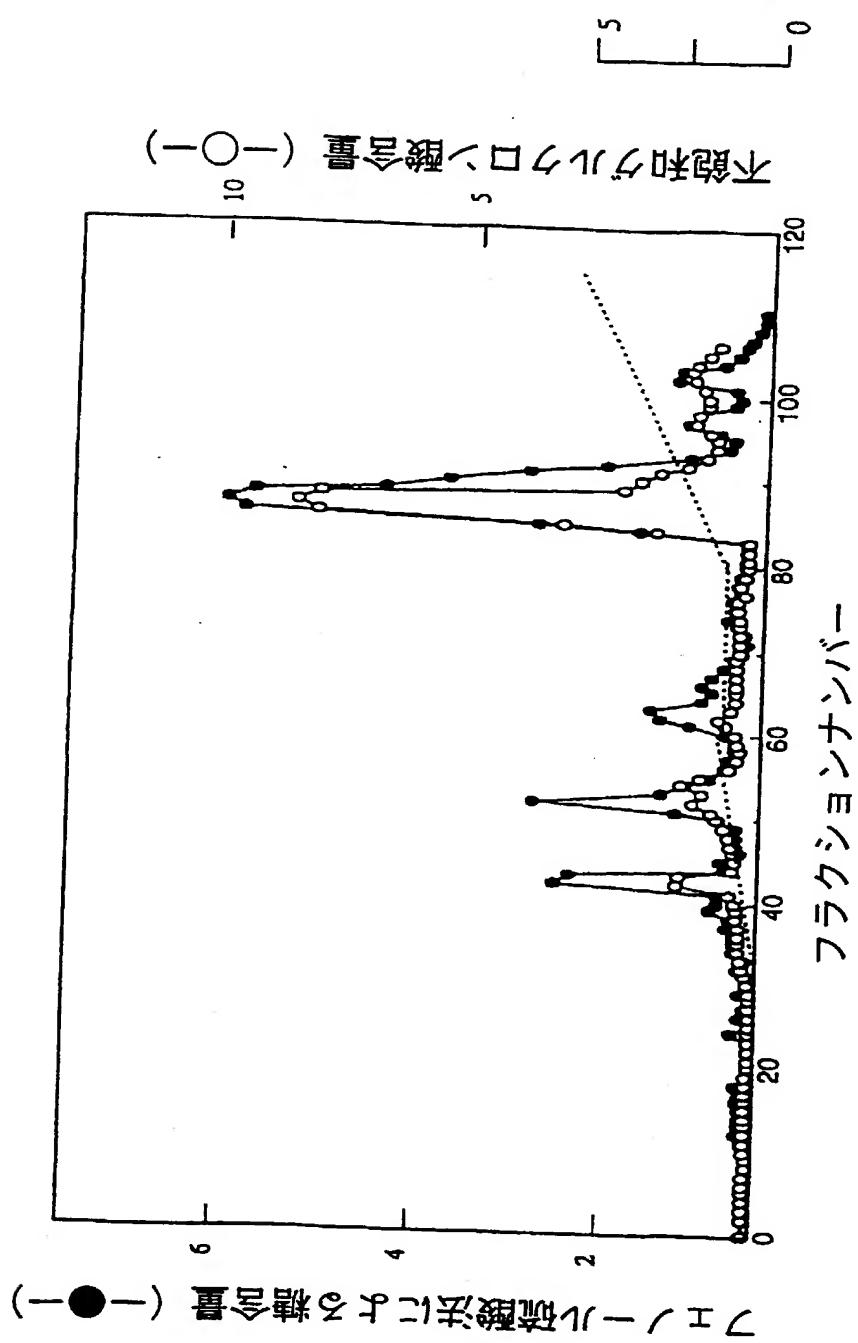
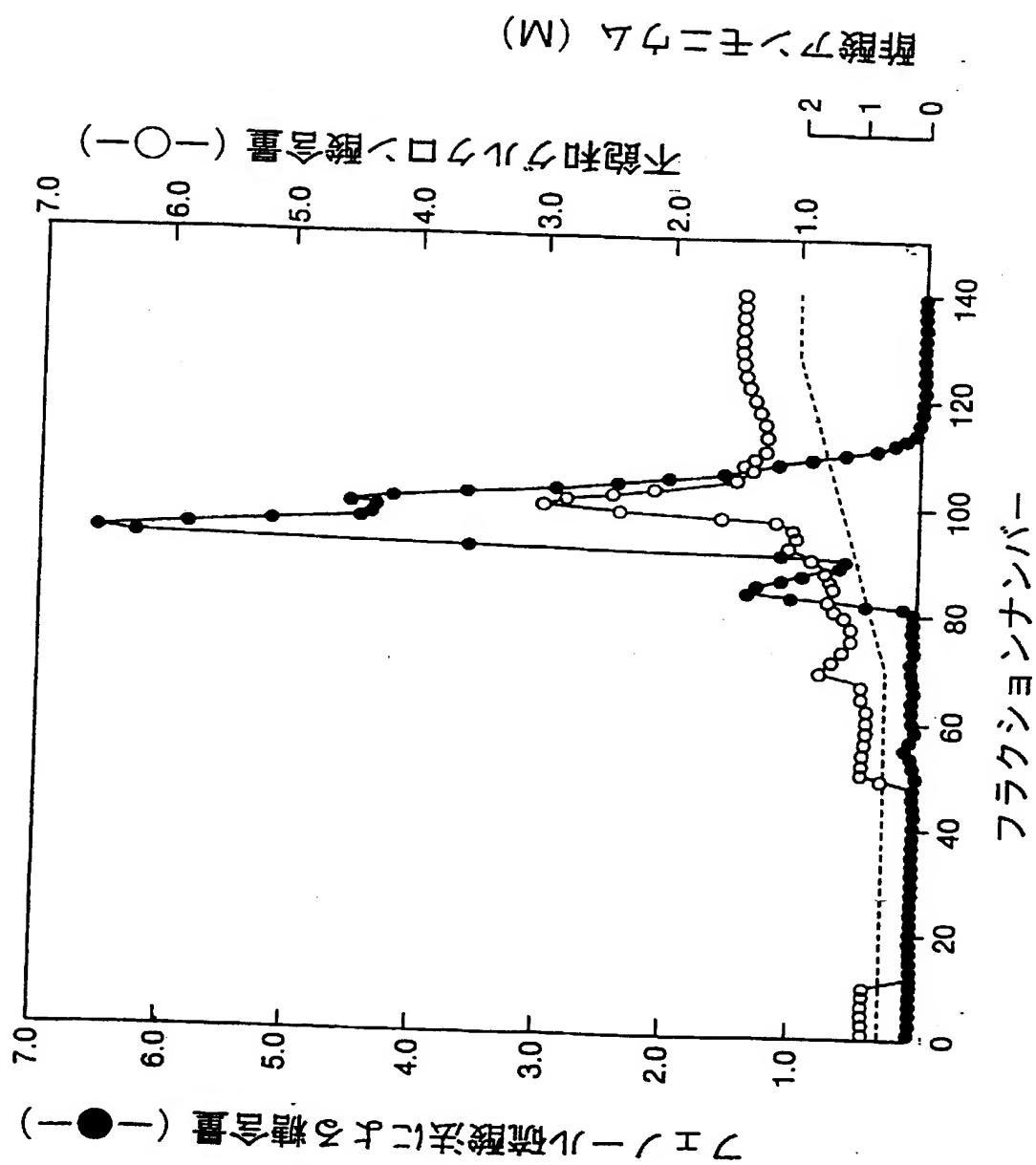


図42



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/01080

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C07H11/00, C12N9/24, C12N1/20, C12P19/14

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C07H11/00, C12N9/24, C12N1/20, C12P19/14

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAS ONLINE, BIOSIS PREVIEWS, WPI/L

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 7-59563, A (K.K. Tosa Kogaku Kenkyusho), March 7, 1995 (07. 03. 95) (Family: none)	1 - 12
PA	JP, 7-215990, A (K.K. Tosa Kogaku Kenkyusho), August 15, 1995 (15. 08. 95) (Family: none)	1 - 12
PA	JP, 8-266, A (K.K. Tosa Kogaku Kenkyusho), January 9, 1996 (09. 01. 96) (Family: none)	1 - 12

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

- Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search July 19, 1996 (19. 07. 96)	Date of mailing of the international search report August 6, 1996 (06. 08. 96)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP96/01080

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1° C07H11/00, C12N9/24, C12N1/20, C12P19/14

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1° C07H11/00, C12N9/24, C12N1/20, C12P19/14

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE, BIOSIS PREVIEWS, WPI/L

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	J P, 7-59563, A (株式会社精良工学研究所) 7.3月.1995 (07.0 3.95) (ファミーなし)	1-12
PA	J P, 7-215990, A (株式会社精良工学研究所) 15.8月.1995 (15 .08.95) (ファミーなし)	1-12
PA	J P, 8-266, A (株式会社精良工学研究所) 9.1月.1996 (09.01.9 6) (ファミーなし)	1-12

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19. 07. 96

国際調査報告の発送日 06.08.96

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

谷 口 博

4B 7432

電話番号 03-3581-1101 内線 3448